

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Keemia instituut

Anton Mastitski

**Mõnede asa-aminohapete prekursorite sünteesimeetodite
väljatöötamine ja optimeerimine**

Magistritöö

Juhendaja: Prof. Jaak Järv

Tartu 2014

Sisukord

	Töös kasutatud lühendid	3
1.	Sissejuhatus	4
2.	Kirjanduse ülevaade	5
2.1	Asa-peptiidid ja nende sünteesi põhilised meetodid	5
2.1.1	Hüdrasiinide alküülimine ja asa-aminohapete prekursorite süntees alküülimise teel	9
2.1.2	Asa-aminohapete prekursorite süntees alküülhüdrasiinide kaitsmise teel	11
2.1.3	Asa-arginiini süntees	12
3.	Eksperimentaalne osa	15
3.1	Aparatuur ja töövahendid	15
3.2	Reaktiivide ja solventide füüsikalised omadused	15
3.3	Sünteeside skeemid	16
3.3.1	N-(Fmoc, Boc) kaitstud asa-Metioniini prekursorite süntees	16
3.3.2	N-kaitstud asa-Fenüülalaniini prekursorite süntees alküülimise teel	17
3.3.3	N-kaitstud Asa-Tyr(OCH ₃) prekursorite süntees	18
3.3.4	N-kaitstud asa-Tyr(Boc/Bn) prekursorite süntees	18
3.3.5	N-(Fmoc, Boc) kaitstud asa-Trp(Z) prekursorite süntees	19
3.4	<i>Üldised sünteesimeetodid ja sünteesitud ainete iseloomustused</i>	20
4.	Tulemused ja nende arutelu	31
4.1	Asa-metioniini süntees atsetaalist	31
4.2	Asa-aminohapete prekursorite süntees alküülimise teel	32
5.	Kokkuvõte	36
6.	Summary	37
	Tänuavaldus	38
	Kasutatud kirjandus	39
	Lisa	42

Töös kasutatud lühendid:

ACN	atsetonitriil
AcOH	äädikhape
Alloc	Allüüloksükarbonüül-
BnBr	bensüülbromiid
BnCl	bensüükloriid
Boc	<i>tert</i> -butüüloksükarbonüül-
BTC	bis(triklorometüül)karbonaat
DCM	diklorometaan
DiPEA	diisopropüületüülamiin
DMF	<i>N,N</i> -dimetüülformamiid
DMSO	dimetüülsulfoksiid
EA	etüülatsetaat
EtOH	etanool
Fmoc	Fluorenüülmetüüloksükarbonüül-
IP	infrapunaspektroskoopia
MeOH	metanool
HRMS	Kõrglahutusega massi-spektroskoopia
NMP	<i>N</i> -metüülpürrolidoon
PE	petrooleeter
PG	kaitserühm (<i>protecting group</i>)
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> (peptiidide süntees tahkel kandjal)
Z	Bensüüloksükarbonüül-
Ddz	3,5-dimetoksü- α,α -dimetüülbensüül
TEA	trietüülamiin
TFA	trifluoroäädikhape
Troc	2,2,2-trikloroetüüloksükarbonüül-
TLC	planaarkromatograafia (<i>thin layer chromatography</i>)
TMR	Tuuma magnetresonantsspektroskoopia

1. Sissejuhatus

Väga paljusid füsioloogilisi protsesse reguleerivad erinevad looduses esinevad peptiidid, mis võiksid seega olla head raviainete kandidaadid. Kahjuks aga segab peptiidide kasutamist ravimitena nende kiire degradatsioon elusrakkudes. Degradatsiooniga seotud probleemi lahendamiseks uuritakse peptiidide analooge ehk peptidomimeetikuid, mis oma toime poolest on võrreldavad looduslike peptiididega, aga samas omavad suuremat stabiilsust. Peptiidide stabiilsuse tõstmiseks on mitmeid variante, üks nendest on peptiidahelas olevate α -aminohapete asendamine nende hüdrasino- e. asa-analoogidega, mida looduses ei esine.

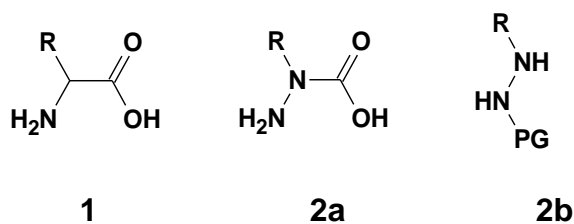
Asa-aminohapped on ebastabiilsed ja seetõttu kasutatakse neid nn. prekursorite kujul, mis kujutavad endast kaitstud *N*-alküülhüdrasiine. Nende sünteesimiseks kasutatakse 3 põhilist sünteetilist teed: redutseeriv amiinimine, kaitstud hüdrasiinide alküülimine ja alküülhüdrasiinide kaitsmine. Kõige levinum on redutseeriva amiinimise meetod, kuid elektronefitsiitseid hüdrasooone saab redutseerida vesinikuga Pd/C või Pd(OH)₂/C katalüsaatori abil. See ei ole väga selektiivne reaktsioon, sageli kaasneb sellega saaduse üleredutseerimine ning see meetod nõuab kalleid katalüsaatoreid ja spetsiaalset aparatuuri. Lisaks sellele vajab redutseeriv amiinimine vaba karbonüülrühmaga ühendi kasutamist, mis on suureks probleemiks, kui karbonüülühend sisaldab nukleofiilseid rühmi, mis seda destabiliseerivad. See võib olla üheks põhjuseks, miks seni ei ole sünteesitud kõigile looduslikele aminohapetele vastavaid asa-analooge. Võttes arvesse neid redutseeriva amiinimisega seotud probleeme, otsustati saada aromaatsete külgahelatega asa-aminohapete prekursoreid alküülimise teel, vältides probleemset redutseerimise etappi ning uurida ja optimeerida seda reaktsiooni. Lisaks sellele tekkis vajadus meetodi järgi, mis võimaldaks kasutada redutseerivat amiinimist kaitstud karbonüülrühmaga aldehüüdide ja ketoonide korral ning mis võimaldaks sünteesida mõningaid seni kirjeldamata asa-aminohapete prekursoreid.

Nende probleemide lahendamisele on pühendatud käesolev töö.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Asa-peptiidid ja nende sünteesi põhilised meetodid

Asa-peptiidid kujutavad endast looduslike peptiidide analooge, kus ühes või mitmes aminohappe jäägis (**1**) on α -süsinikuaatom asendatud lämmastiku aatomiga (**2a**). Sellised peptiidid on proteaaside ja muude organismis leiduvate peptiidsidet lagundavate ensüümide suhtes tavalistest peptiididest stabiilsemad (Boeglin, 2005), mis teeb nendest perspektiivsed ravimikandidaadid (Zega, 2005; Proulx, 2011). Kuid samas on need looduslike aminohapete analoogid (**2a**) ise keemiliselt ebastabiilsed. Seetõttu kasutatakse sünteesides nende ühendite prekursoreid (**2b**), mis on vaadeldavad kui kaitstud alküülhüdrasiinid (**Skeem 1**).

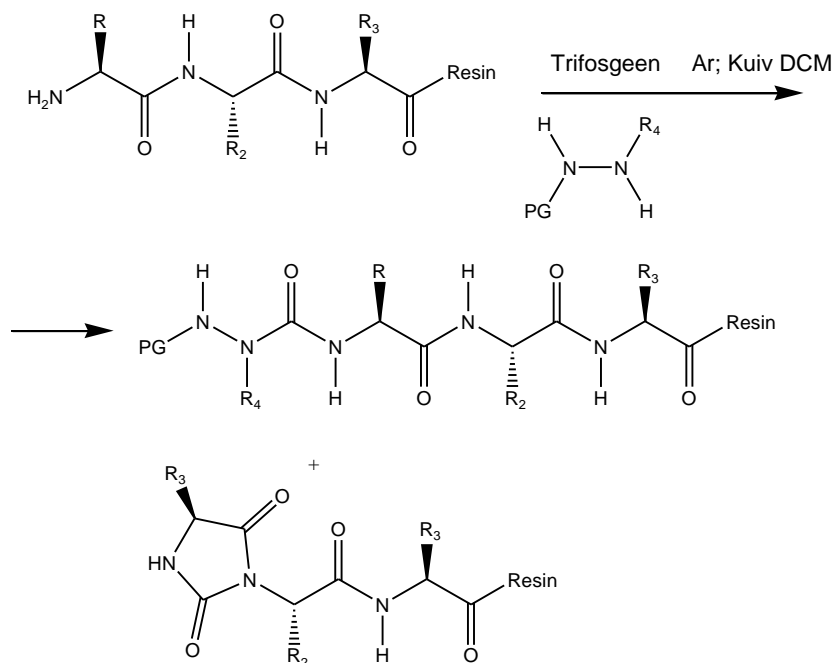


Skeem 1. 1 - aminohape ; 2a - asa-aminohape (ebastabiilne aine); 2b - asa-aminohappe prekursor ehk kaitstud alküülhüdrasiin (PG = kaitserühm)

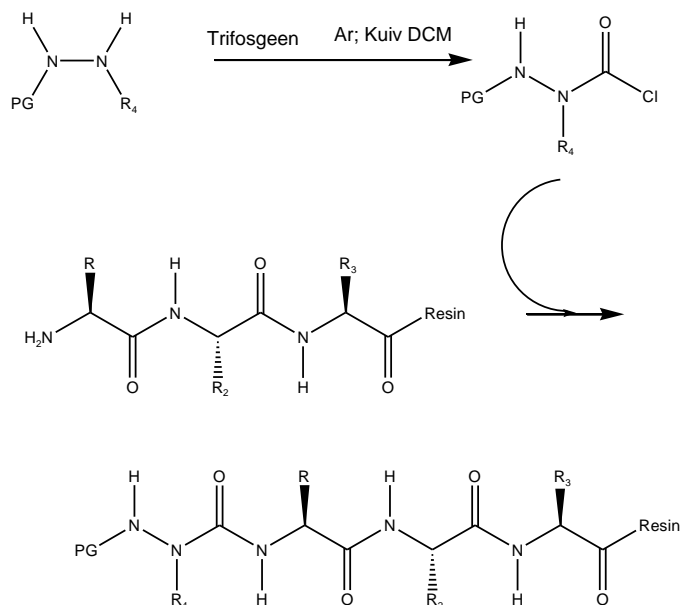
Asa-peptiidi valmistamine sarnaneb üldjoontes tavalise peptiidsünteesiga. Erinevuseks on ainult asa-aminohappe sidumise etapp ja järgmise aminohappe sidumine vaba hüdrasino-terminuse külge. Asa-peptiidide sünteesiks kasutatakse põhiliselt kahte meetodit (Boeglin, 2005). Nendest esimese järgi konverteeritakse tahke kandja küljes oleva peptiidi terminaalne NH_2 -rühm aktiivseks isotsüanaadiks (Boeglin, 2005). Seejärel teostatakse reaktsioon vajaliku asa-aminohappe prekursoriga (**Skeem 2**, 1). Teise lähenemise kohaselt valmistatakse hüdrasiinse prekursori ja trifosgeeni vahelises reaktsioonis kloroatsüül derivaat ning seejärel teostatakse vastava atsüülkloriidi reaktsioon peptiidi N-terminusega. Reaktsiooni läbiviimiseks on kasutatud nii fosgeeni lahust kui ka trifosgeeni (BTC): mõlema reaktsiooni abil saab reagenti lihtsalt sisse viia vajaliku kloroatsüül rühma (**Skeem 2**, 2) (Boeglin, 2005). Samas on tähtis märkida, et vaatamata antud valdkonnas tehtud

töödele, teeb asa-peptiidide sünteesi raskeks just hüdrasiinoterminuse külge järgmise aminohappe liitmine, mis on tingitud hüdrasino-rühma oluliselt väiksemast nukleofiilsusest, mistõttu on asa-peptiidide saagised üsna madalad (Mastitski, 2012).

1)

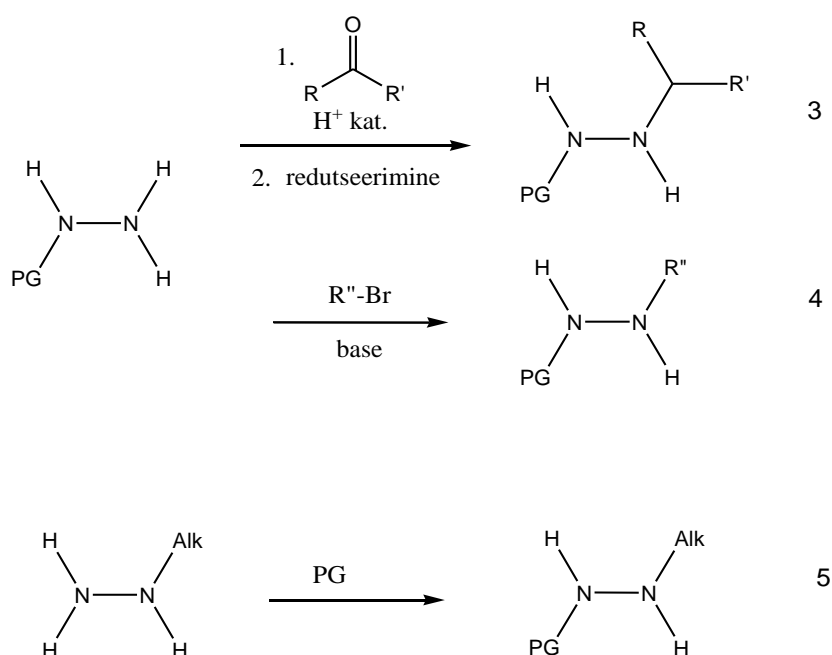


2)



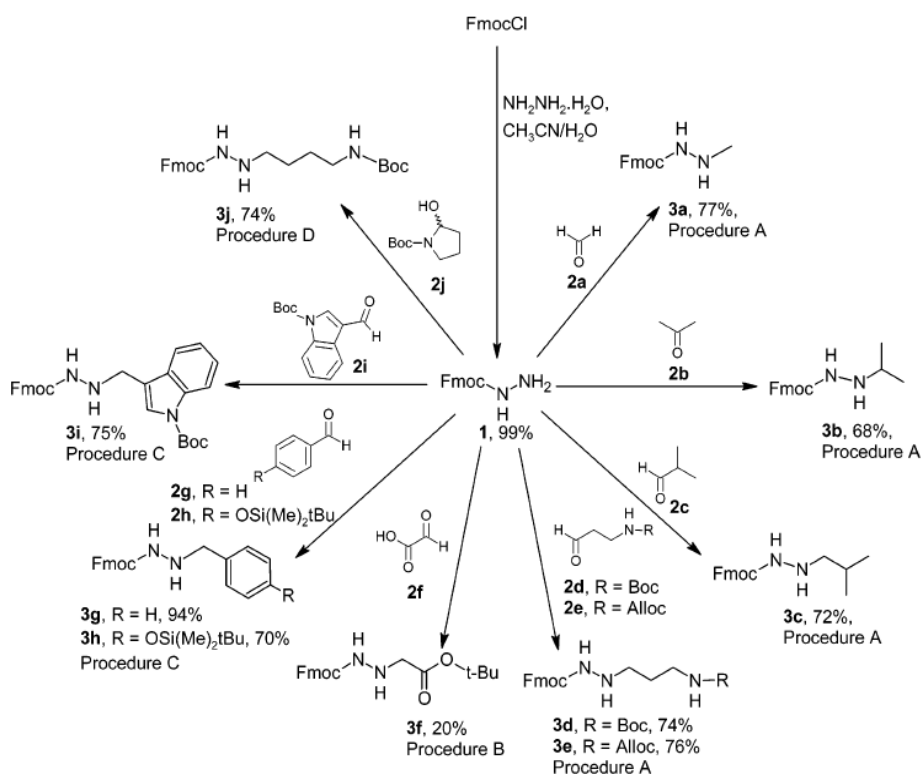
Skeem 2. Asa-peptiidide sünteesi strateegiad. 1) hüdrasiini atsüülimine süsihappe derivaatide vahendamisel; 2) astmeline süntees tahkel kandjal (SPPS).

Skeem 3 näitab erinevate asa-aminohapete prekursorite sünteesi jaoks kasutatavaid peamisi võtteid. Lähtudes kaitstud hüdrasiinist (PG-NHNH₂) ja muutes seda hüdrasooniks, saame komplekshüdriidiga (NaBH₃CN; NaBH₄; Pd/C/H₂) redutseerimisel prekursori (**Skeem 3**, 3). Teine variant seisneb PG-NHNH₂ alküülimises alküülhalogeniidiga (**Skeem 3**, 4). Kolmandaks variandiks on alküülhüdrasiinide kaitsmine, mida saab aga kasutada juhul, kui vastav lähteaine on kättesaadav (**Skeem 3**, 5).



Skeem 3. Asa-aminohapete prekursorite sünteesi võimalused: 3 - redutseeriva amiinimise meetod; 4 - alküülimine alküülhalogeniididega; 5 - alküülhüdrasiini kaitsmine.

Lähtudes **Skeemil 3** toodud meetoditest ning kasutades erinevaid reaktsioonitingimusi saab valmistada suurema osa asa-peptiidide sünteesiks vajalikke prekursoreid (**Skeem 4**). Samas on aga mitmete aminohapete (histidiini, metioniini, tsüsteiini jne) asa-analoogide prekursorite süntees seni kirjeldamata. Selle põhjuseks on erinevaid raskused sünteesi teostamisel või sünteesiks vajalikke reagentide ebastabiilsust. Samas vajab aga täisulatuslik looduslike peptiidide asa-analoogide süntees täielikku looduslike aminohapete asa-analoogide komplekti.



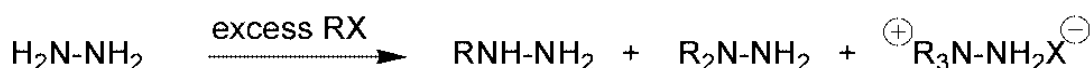
Skeem 4. Asa-aminohapete prekursorite sünteesis lähtudes fluorenüülkloroformiaadist (Boeglin, 2005).

Tähtis on märkida, et üle hüdrasoonide kulgev prekursorite sünteesitee on lihtne ja mugav, kui on tegemist alifaatsete asa-aminohapete prekursoritega. Aromaatsete hüdrasoonide korral kasutatakse aga komplekshüdriididega redutseerimise asemel redutseerimist vesinikuga ning Pd(OH)₂/C (Boeglin, 2005) või Pd/C katalüsaatoreid (Melendez, 2004). Sama meetodikat on kasutatud ka varasemates töodes (Kline, 1961). Aromaatsete aldehüüdide ja ketoonide hüdrasoonide redutseerimist raskendab see, et hüdrasooni -C=N- side on konjugatsioonis aromaatsüsteemiga, mis raskendab komplekshüdriidi aniooni liitumist. Pealegi ei ole elektronefetsiitsete hüdrasoonide Pd-katalüütiline redutseerimine H₂-ga eriti selektiivne protsess ja vajab hoolikat reaktsiooni kulgemise kontrolli, et vältida aine üleredutseerimist (Dutta, 1975; Freeman, 2009). Nende probleemide vältimiseks on näiteks Ddz-kaitstud aromaatsete asa-aminohapete prekursorite saamiseks kasutatud Pd/C/H₂ asemel suurt NaBH₃CN ja CH₃COOH ülehulka ja reaktsiooni teostamist kõrgemal temperatuuril (Freeman, 2009).

Arvestades ülaltoodut, pakub huvi külghelates aromaatsaid rühmi sisaldavate as-aminohapete prekursorite süntees hüdrasiinide alküülimise teel. Lisaks võimalusele loobuda kallist katalüsaatorist ja gaasilise vesiniku kasutamisest võimaldab alküülimine vähendada ka reaktsiooni etappide arvu kahelt ühele.

2.1.1 Hüdrasiinide alküülimine ja as-aminohapete prekursorite süntees alküülimise teel

Hüdrasiinide alküülimine alküülhalogeniididega ei ole kuigi selektiivne reaktsioon, sest moodustuv alküülhüdrasiin on märgatavalt nukleofiilsem kui hüdrasiin, mistõttu tekivad kergesti di-alküülitud ja enam alküülrühmi sisaldavad kõrvalproduktid, seda eriti alküüliva reagenti ülehulga korral (**Skeem 5**).



Skeem 5. Hüdrasiinide alküülimise produktid. RX alküülhalogeniid (X= Cl, Br; I). (Ragnarsson, 2001).

Lisaks alküülhalogeniididele on hüdrasiinide alküülimiseks kasutatud ka teisi alküülivaid reagente, näiteks dialküülsulfaate, oksiraane jne. (Ragnarsson, 2001).

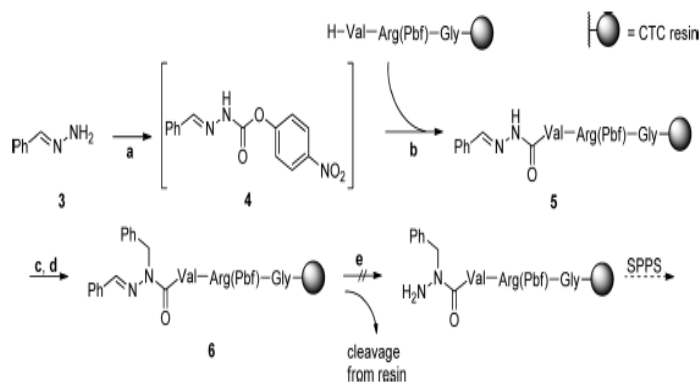
Selleks, et vähendada hüdrasiini polüalküülimist, kasutatakse tavaliselt suuri hüdrasiini ülehulkasid. See võtte võimaldab saada oluliselt suuremat monoalküülitud hüdrasiini saagist, suurendades reaktsiooni käigus vaba (mittealküülitud) hüdrasiini reageerimise tõenäosust. Tavaliselt kasutatakse 3-10 kordseid hüdrasiini ülehulkasid, mittereageerinud hüdrasiini saab vajadusel regenereerida reaktsioonisegu puhastamise käigus.

Hüdrasiini alküülimise korral mängib väga tähtsat rolli solvent ja vahel sõltub sellest otsene reaktsiooni kulgemise tee, vajaliku produkti saagis ja kõrvalproduktide hulk. Üldiselt on alküülimisi kasulik teostada polaarsetes aprotoonsetes solventides nagu DMF (Hansen, 1999). Kuid DMF puhul on täheldatud ka seda, et reaktsiooni kulgemiseks vajalikul kõrgel temperatuuril moodustub ka formüülitud hüdrasiin. Seega on kasulik DMF asemel kasutada teisi polaarsete aprotoonsete solvente nagu ACN, DMSO ja NMP. Lisaks polaarsetele aprotoonsetele solventidele kasutati hüdrasiinide alküülimiseks ka etanooli keskkonda (Kost, 1963). Selles töös on

väidetud, et etanooli kasutamine hüdrasiinide alküülimiseks vähendab oluliselt N-aatomi polüalküülimist. Seda meetodikat on laialt kasutatud erinevate monoalküülhüdrasiinide (bensüülhüdrasiin, nonüülhüdrasiin jne) sünteesiks (Kost, 1963). Lisaks sellele on etanoolis alküülimist teostatud erinevate asendatud bensüülhüdrasiinide saamiseks (Ou, 2012). Monoalküülitud hüdrasiinide saagised olid umbes 60%. See meetodika leidis rakenduse ka selles töös.

Hüdrasiinide kasutamisel on tähtis aluse juuresolek, mis seob reaktsiooni käigus eralduvat vesinikhalogeniidi ja takistab reaktsioonivõimelise hüdrasiini kontsentratsiooni langust hüdrasooniumsoola moodustumise tõttu. Tavaliselt kasutatakse alustena tertsiarseid alküülamiine (TEA, DiPEA) või püridiini derivaate. Kui reaktsiooni teostatakse suure hüdrasiini ülehulgaga, siis eralduv hape seostub nii lähteaineks oleva hüdrasiiniga kui ka alküülitud hüdrasiiniga.

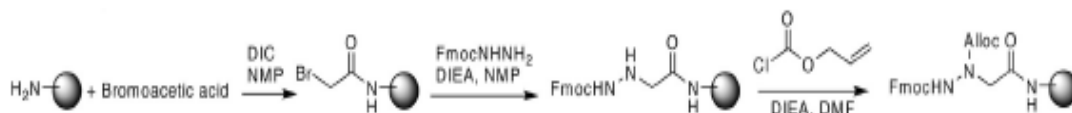
Alküülimise teel valmistati erinevaid asa-aminohappeid sisaldavaid asa-peptiide, nagu on näidatud skeemil 6, kus kujutatakse asa-Phe sisaldavat asa-peptiidi sünteesi (**Skeem 6**).



^aReagents and conditions: (a) *p*-nitrophenyl chloroformate, DCM, 0 °C → rt, 2 h; (b) DIEA, DCM, rt, 16 h; (c) KO^tBu, THF, 30 min; (d) benzyl bromide, THF, 12 h; (e) NH₂OH·HCl, pyridine, 60 °C, sonication.

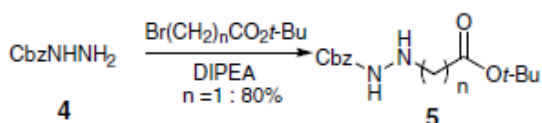
Skeem 6. Otsene bensüülimine asa-peptiidide sünteesil (Spiegel, 2012). Viidatud töös kirjeldatakse bensüül-rühma sisestamist BnBr abil.

Asa-peptiidide sünteesis on kasutatud ka tahke kandja küljes olevat alküülivat reagenti. Sellist meetodit (**Skeem 7**) on kasutatud Fmoc-NHNH₂ alküülimiseks tahke kandja külge seotud 2-bromoäädikhape abil. Ühtlasi on teostatud ka Alloc-kaitserühma sisseviimine.

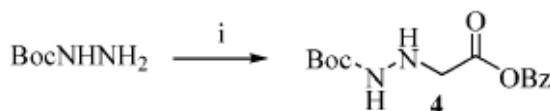


Skeem 7. Asa-Asn süntees alküülimise etappi kasutades (Lee, 2010)

Erinevate kaitstud hüdrasiinide alküülimist on laialdaselt teostatud ka erinevate halogeenitud karboksüülhapete derivaatidega (**Skeem 8, 9**)



Skeem 8. N-Z-asa-aspargiinhappe prekursori süntees alküülimise teel (Busnel, 2007).



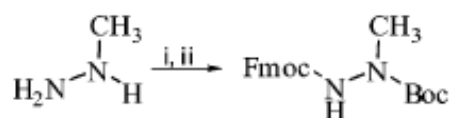
Skeem 9. N-Boc-asa-aspargiinhappe prekursori süntees *tert*-butüülkarbasaadi bensüül-2-bromoatsetaadiga alküülimise teel (Busnel et al., 2005)

On mainitud ka Boc-NHNH₂ metüülimise katseid metüüljodiidiga (Melendez, 2004), mis ei andnud aga vajalikku produkti. Samuti ei õnnestunud leida kirjandusest andmeid külgahelates aromaatsiid rühmi sisaldavate asa-aminohapete prekursorite alküülimise teel sünteesi kohta.

2.1.2 Asa-aminohapete prekursorite süntees alküülhüdrasiinide kaitsmise teel

Asa-aminohapete prekursoreid on võimalik valmistada ka vastavast alküülhüdrasiinist teise N-aatomi kaitsmise teel. Kaitsmiseks kasutatakse reeglina ortogonaalseid kaitserühmi (Z-; Boc-; Fmoc-, Troc-; Alloc- jne), mille kombinatsioonid võimaldavad selektiivselt eemaldada ühe kaitserühma teise juuresolekul. Selleks pannakse alküülhüdrasiin reageerima kas vastava kloroformiaadiga (Z-Cl; Fmoc-Cl; Troc-Cl; Alloc-Cl) või Boc₂O-ga aluse juuresolekul. Kloroformiaatide kasutamise korral kasutatakse reeglina alust ülehulgas, mis aitab siduda eralduvat HCl ning seega hoiab ära erinevaid kõrvalreaktsioone. Boc₂O kasutamise korral piisab ainult aluse katalüütilisest kogusest.

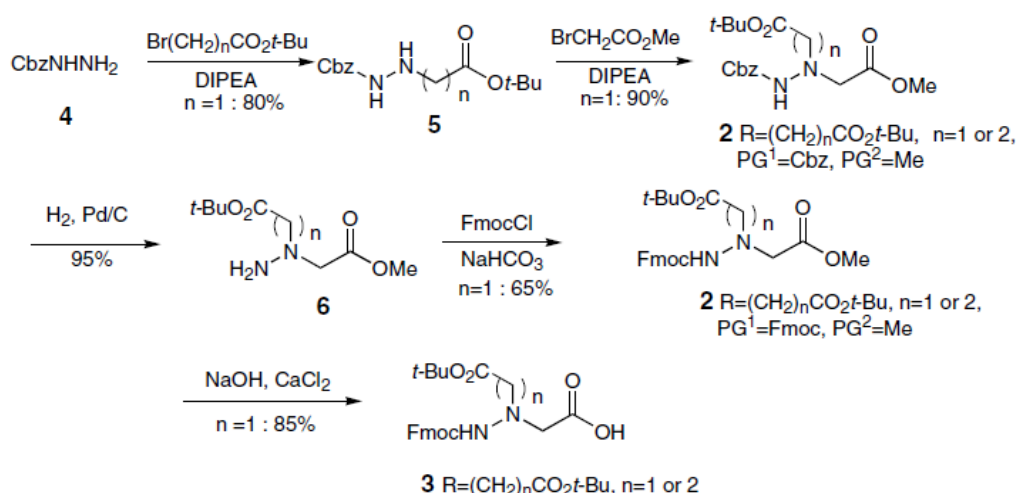
Järgnevalt on toodud mõned näited asa-aminohapete prekursorite sünteesi kohta, kasutades alküülhüdrasiinide kaitsmist (**Skeem 10** ja **Skeem 11**).



Skeem 10. Boc- ja Fmoc- rühmadega kaitsmine metüülhüdrasiini korral.

Tingimused: i- Boc_2O ; CHCl_3 ; ii – Fmoc-Cl ; $(\text{Et})_3\text{N}$. (Busnel, 2005).

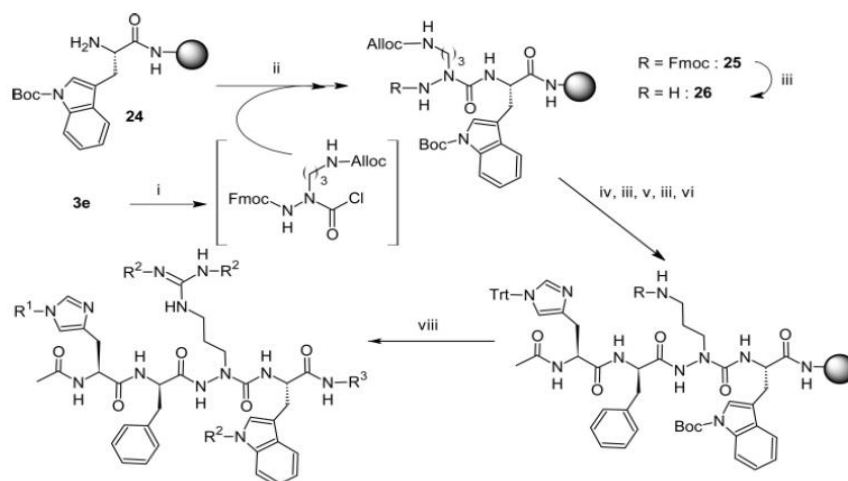
Sageli kasutatakse vajaliku asa-aminohappe prekursori sünteesis nii alküülimist, kaitsmist kui ka kaitserühmade väljavahetamist (**Skeem 11**).



Skeem 11. Fmoc-asa- β^3 -Asn prekursori süntees, kasutades Fmoc-rühma sisseviimist (Busnel, 2007)

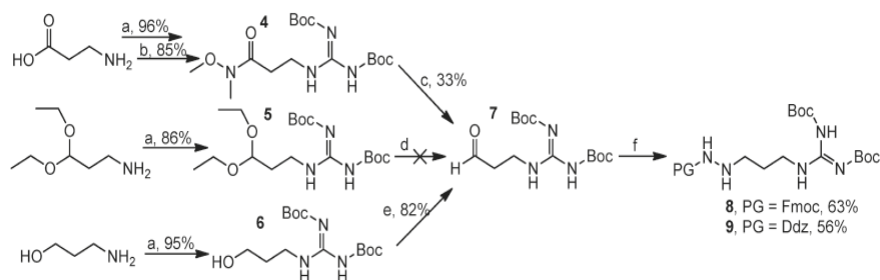
2.1.3 Asa-argniniini süntees

Asa-argniniini sünteesi jaoks on teada 2 erinevat meetodit. Üks nendest põhineb ω -N-Alloc kaitstud asa-ornitiini sisseviimisel peptiidi, millele järgneb Alloc rühma selektiivne eemaldamine ja funktsionaalrühma guanidileerimine *N,N'*-bis-Boc-1-guanüülpürasooli abil (Bernatowicz, 1993). Selle tulemuseks on asa-Arg lülitumine peptiidi (Boeglin, 2005). (**Skeem 12**).



Skeem 12. Asa-Arg sisaldavate peptiidide süntees asa-ornitiini guanidileerimise teel (Boeglin, 2005).

Teise meetodi kohaselt teostati Fmoc- kaitstud asa-Arg prekursori süntees redutseeriva amiinimise teel, kasutades Fmoc-NHNH₂ kondensatsiooni 3-(Nω,Nω-di-Boc-guanidilüül)propanaaliga, millele järgnes saadud hüdrasooni redutseerimine NaBH₃CN abil. Vajalik karbonüülne ühend (aine **7**, **Skeem 13**) võib olla valmistatud erineval viisil. Ühes valmistamiseviisis kasutatakse 3-aminopropanooli guanidileerimist *N,N'*-bis-Boc-metüülsotiourea abil DMAP juuresolekul, millele järgneb oksüdatsioon Dess-Martini reagenti abil. Teise variandi järgi saab kasutada lähteainena 3-aminopropaanhapet, guanidileerida aminorühma *N,N'*-bis-Boc-metüülsotiourea abil ning muuta karboksüülrühm *N,O*-dimetüülhüdroksüülamiinvesinikkloriidi ning PyBOP ja DiPEA juuresolekul vastavaks Weinreb'i amiidiks e *N,O*-dimetüülhüdroksüülamiidiks (aine **4**, **Skeem 13**). Weinreb'i amiid redutseeritakse LiAlH₄ abil, mille tulemusena moodustub aldehüüd. Kolmas variant lähtub 3-aminopropanaali dietüülatsetaalist, mille aminorühm guanidileeritakse *N,N'*-di-Boc-metüülsotiourea abil ning saadakse 3-(*N,N*-di-Boc-guanidilüül)propanaali dietüülatsetaal (aine **5**, **Skeem 13**). Samas edaspidine atsetaali hüdroolüüs AcOH/vee segus tulemusi ei andnud. (Freeman, 2011). Seega aldehüüdi atsetaali hüdroolüüs oli raskendatud, mis võib olla põhjustatud liiga nõrgalt happelisest keskkonnast, kus hüdroolüüs ei toimunud. Samasugune probleem esineb ilmselt üldiselt ning takistab asa-aminahapete prekursorite sünteesi.



^a Reagents: (a) *N,N'*-bis-Boc-methylisothiourea, DMAP; (b) *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride, PyBop, DIPEA; (c) LiAlH_4 ; (d) $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$; (e) Dess–Martin periodinane; (f) (1) PG-NH-NH₂ then (2) NaCNBH_3 , AcOH.

Skeem 13. Asa-Arg prekursorite süntees. (Freeman, 2011)

Lisaks ülaltoodud asa-arginiini sünteesimeetodile on seda ainet edukalt sünteesitud kaitstud hüdrasiinide alküülimise teel, millest on põhjalikult räägitud minu bakalaureusetöös (Mastitski, 2012).

3. Eksperimentaalne osa

3.1 Aparatuur ja töövahendid

* TLC MERCK Silica gel 60 F254.

* TMR spektrid mõõdeti Bruker AC 200P (Spectroscopin AG, Switzerland) aparadi abil.

* Ainete kromatograafiliseks lahutamiseks kasutati silikageeli MERCK Silica gel 60-230 (0,063-0,2 mm).

* IP spektrite mõõtmiseks kasutati Perkin-Elmer Spectrum BX spektromeetrit (ATR mõõtmistehnika).

* Elementanalüüs teostati Elementar vario MICRO cube seadme abil (CHNS režiim).

* LRMS ja HRMS spektrid mõõdeti Varian 910-FT-ICR-MS spektromeetri abil, kasutades solvendina atsetonitriili.

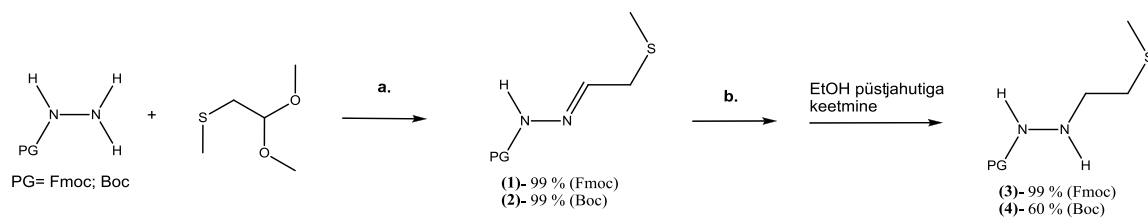
3.2 Kasutatud reaktiivide ja solventide füüsikalised omadused [19].

Aine	M, g/mol	Kt, °C	St, °C	Tihedus, g/ml (20 °C).	n _D ²⁰
ACN	41.05	81-82	-48	0.786	1.344
AcOH	60.05	117-118	16.2	1.049	1.371
DCM	84.93	39.8-40	-97	1.325	1.424
DiPEA	129.24	127	<-50	0.742	1.414
DMF	73.09	153	-61	0.944	1.430
EA	88.11	76.5-77.5	-84	0.902	1.3720
Et ₂ O	74.12	34.6	-116	0.706	1.3530
EtOH	46.07	78	-114	0.789	1.36
Heksaan	86.18	69	-95	0.659	1.3750
Hüdrasiinhüdraat	50.06	120.1	-51.7	1.032	1.428
Kloroform	119.38	60.5-61.5	-63	1.492	1.445
MeOH	32.04	64.7	-98	0.791	1.329
NMP	99.13	81-82	-24	1.028	1.47
TEA	101.19	88.8	-115	0.726	1.401
TFA	114.02	72.4	-15.4	1.489	1.3
THF	72.11	65-67	-108	0.889	1.407

NaOH	40	-	318	-	-
KHSO ₄	136.17	-	214	2.32	-
Indool	117.15	51-54	253-254	-	-
<i>p</i> -hüdoksübensaldehüüd	122.12	112-116	310-311	-	-
Boc-NHNH ₂	132.16	39-42	63-65 (0,1 mm/Hg)	-	-
Bensüülkloriid	126.58	-43	177-181	1.1	1.538
Bensüülbromiid	171.03	(-3) -(-1)	198-199	1.438	1.575
Z-NHNH ₂	166.18	65-68	-	-	-
Z-Cl	170.59	-	103 (20 mm/Hg)	1.195	1.519
Fmoc-Cl	258.70	62-64	-	-	-
2,4,6-trimetüülpüridiin	121.18	-43	171-172	0.917	1.498
PBr ₃	270.69	-41.5	175	2.88	1.697
(2-metüültio)atseetal- dehüüdi dimetüülatsetaal	136.21	-	59-60 (13 mm/Hg)	1.022	1.4528
Troc-Cl	211.86	-	171-172	1.539	1.471
Aloc-Cl	120.53	-	27 (11 mm/Hg)	1.134	1.422
POCl ₃	153.33	1.25	105.8	1.645	-
NaBH ₄	37.83	400	500 (laguneb)	-	-
NaBH ₃ CN	62.84	242(lag.)	-	1.2	-

3.3 Sünteeside skeemid

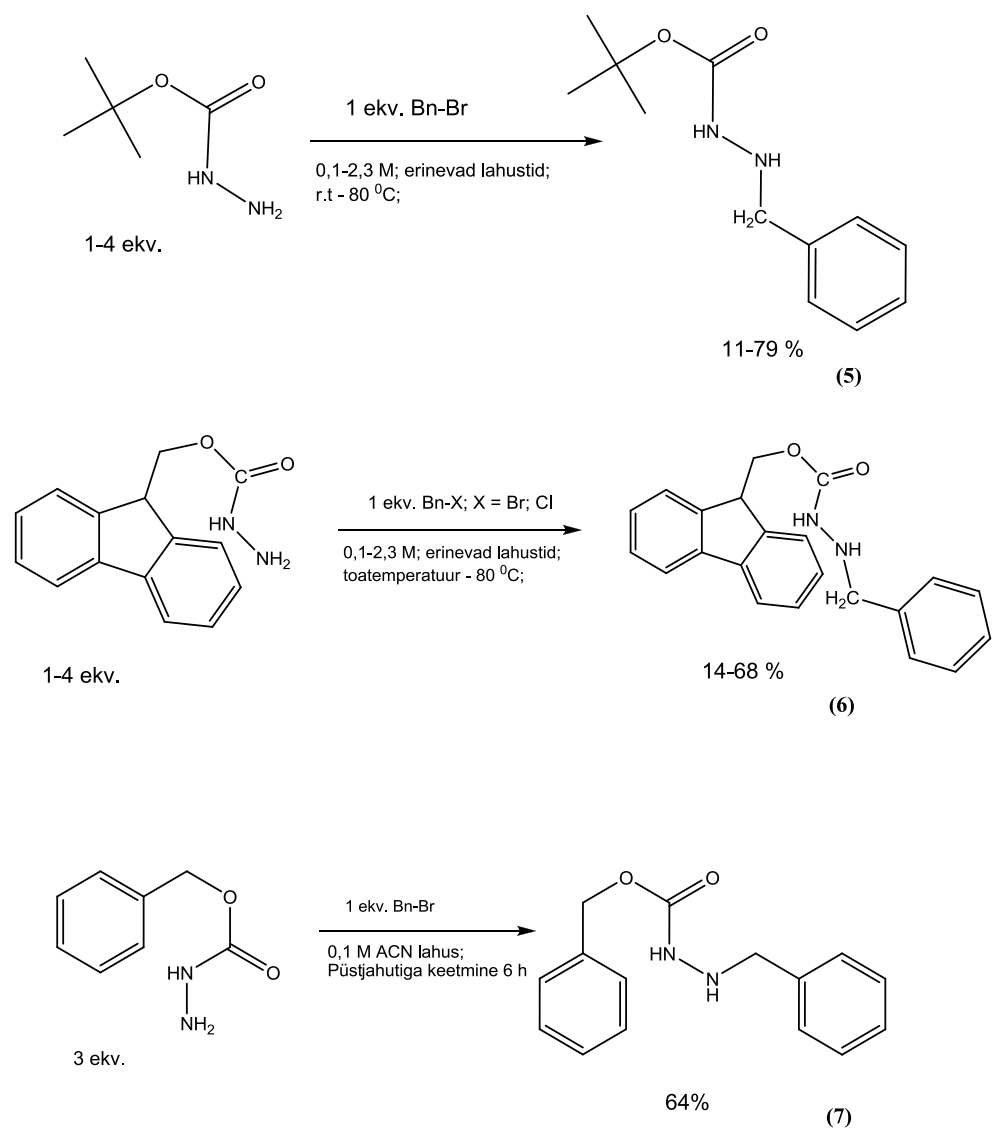
3.3.1 N-(Fmoc, Boc) kaitstud asa-Metioniini prekursorite süntees



Reagendid: **(a.)** EtOH + 5% H₂O, 0,005- 0,1 mol TFA, püstjahutiga keetmine; **(b.)** 3 ekv.. NaBH₃CN, 3 ekv. CH₃COOH, THF.

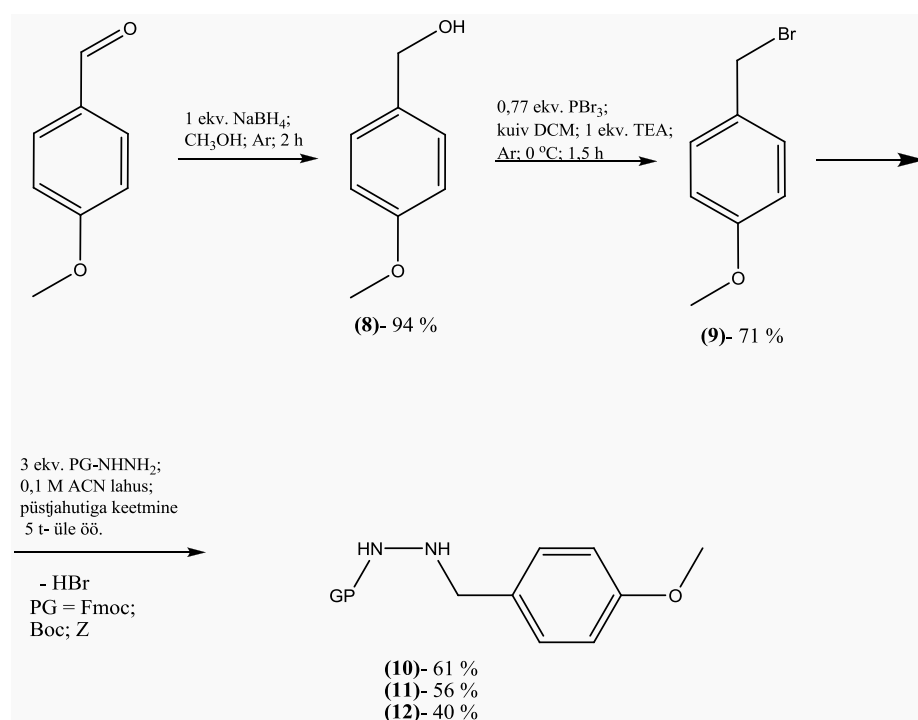
Skeem 14. Asa-Metioniini prekursorite süntees lähtudes (2-metüültio)atseetaldehüüdi dimetüülatsetaalist.

3.3.2 N-kaitstud asa- Fenüülalaniini prekursorite sünteesi alküülimise teel



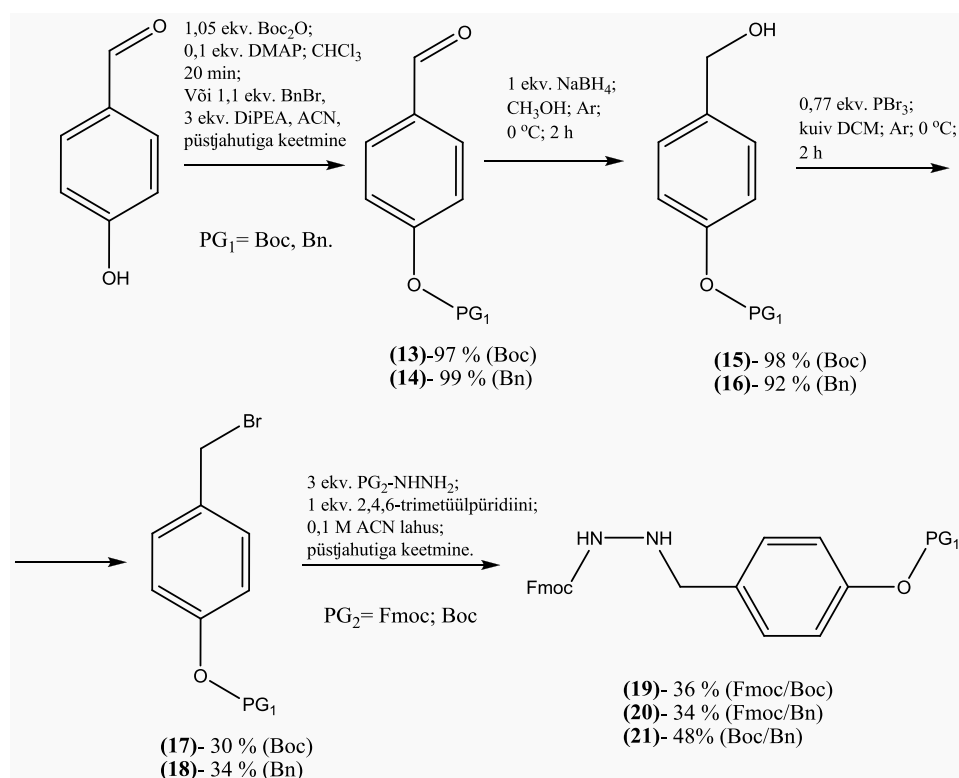
Skeem 15. N-(Boc; Fmoc; Z)-kaitstud hüdrasiinide bensüülimine erinevates tingimustes.

3.3.3 N- kaitstud Asa-Tyr(OCH₃) prekursorite süntees



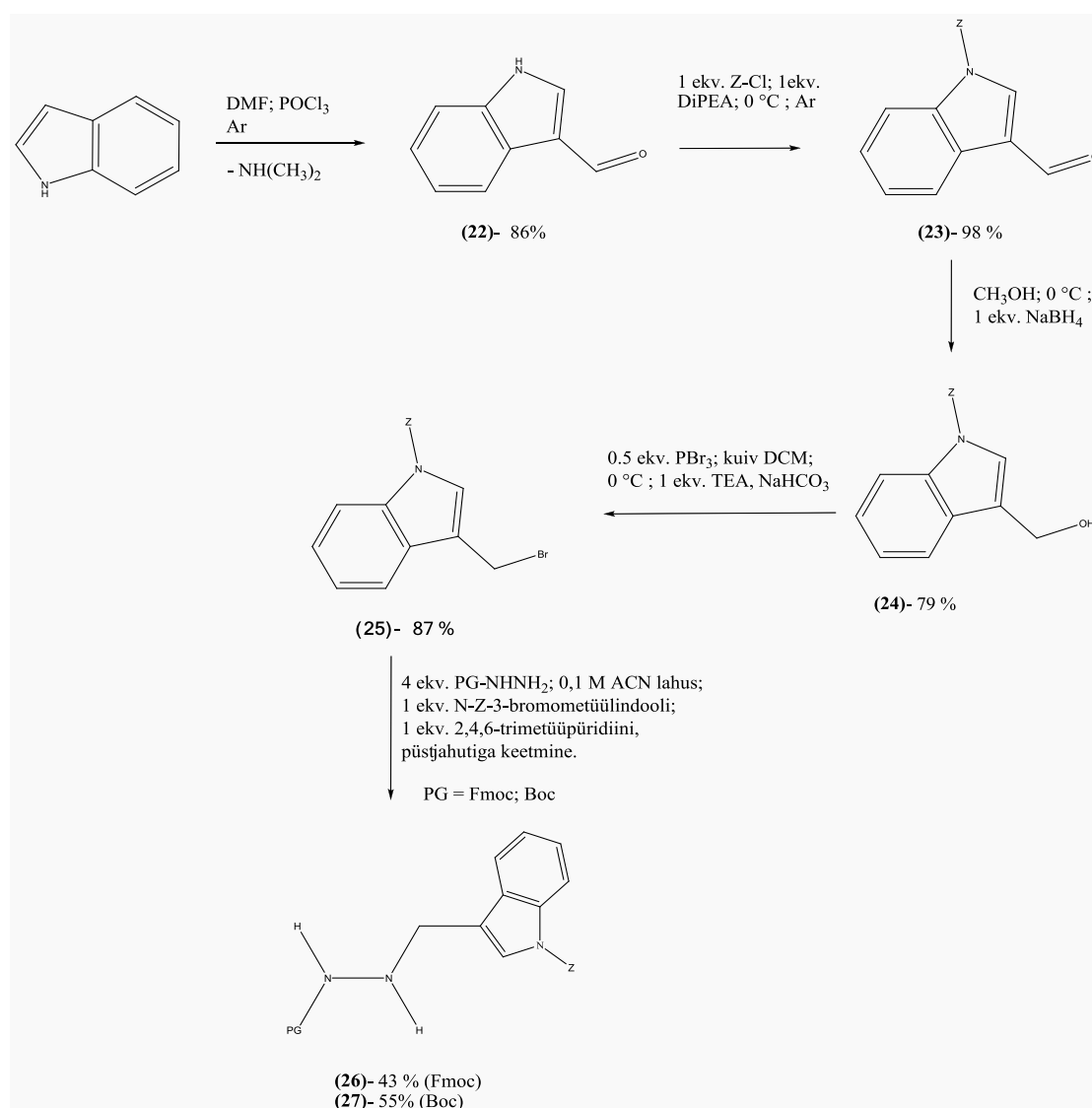
Skeem 16. N-kaitstud (Fmoc-;Boc-; Z-) asa-Tyr-OCH₃ prekursori süntees.

3.3.4 N-kaitstud asa-Tyr(Boc/Bn) prekursorite süntees



Skeem 17. Fmoc-NHNH-CH₂-Ph-4-O-Boc süntees.

3.3.5 N-(Fmoc, Boc) kaitstud asa-Trp(Z) prekursorite süntees



Skeem 18. N-Boc- ja N-Fmoc-asa-Trp(Z) prekursorite süntees lähtudes indoolist.

3.4 Üldised sünteesi meetodid ja sünteesitud ainete iseloomustused

1) Fmoc-NHNH₂ süntees (Carpino, 1972; Boeglin, 2005)): NH₂NH₂·x H₂O (10 ml; 11 ekv.) lahustati ACN/H₂O 1 : 1 segus, kolb täideti Ar-ga ning lisati jäävannil tilkhaaval Fmoc-kloriidi (4,235 g; 1 ekv.) lahus 120 ml ACN-s. Fmoc-Cl lahus isoleeriti õhuniiskusest Ar abil. ACN aurustati vaakumis, saadud suspensioon filtriti ja pesti mitu korda veega hüdrasiini ülehulga kõrvaldamiseks. Seejärel pesti produkti petrooleetriga ning vakumeeriti. Fmoc-NHNH₂ saadi 93% saagisega.

TMR (CDCl₃). ¹H: δ = 3,8 (s; 2H; NH₂); 4,3 (t; 1H; CH); 4,5 (d; 2H; CH₂); 6,1 (s; 1H; Fmoc(NH)); 7,9-7,4 (m; 8H; Fmoc(Ar)).

¹³C: δ = 47,7 (CH); 67,8 (CH₂); 144,1; 141,8; 128,2; 127,5; 125,3; 120,4 (Fmoc(Ar)); 158,9 (C=O).

2) Z-NHNH₂ süntees: 11 ekv. NH₂NH₂ x H₂O segati dietüüleetriga ning jahutati jäävannis. Lisati tilkhaaval intensiivselt segades 1 ekv. bensüülkloroformiaati (Z-Cl). Reaktsioonisegu segati pärast Z-Cl lisamist 1,5 tundi jäävannil, seejärel lasti segada toatemperatuuril üle öö. Dietüüleeter ja suurem osa hüdrasiinhüdraadist eraldati rotaatoraurusti abil. Jääk lahustati EA-s, pesti 2 korda H₂O, küllastunud NaCl lahusega. Veefaasi ekstraheeriti 3 korda EA-ga, ekstrakti pesti küllastunud NaCl lahusega ning ühendati orgaanilise faasiga. Orgaaniline faas kuivatati vv. Na₂SO₄-ga, kuivatav aine eemaldati filtrimise teel. Filtraat kontsentreeriti rotaatoraurusti abil ning saadud jääk vakumeeriti. Z-NHNH₂ saadi 97% saagisega ja ei vajanud edasist puhastamist.

TMR (CDCl₃): ¹H δ = 3.87 (br.s, 2H), 5.15 (s, 2H), 6.72 (br.s, 1H), 7.37 (s, 5H). ¹³C δ = 67.2, 128.2, 128.3, 128.5, 136.2, 158.7. IP: 3322.2; 3031.6; 1710.7; 1632.9; 1496.4; 1454.1; 1344.6; 1266.7; 1214.5; 1055.6; 1027.9; 913.1; 845.0; 736.0; 695.3.

St: 60-64 °C. (69-70 °C kirjanduslik) (Rabjohn, 1948)

3) Üldine meetod atsetaalidest hüdrasoonide sünteesimiseks: 1 ekv PG-NHNH₂ (PG= Fmoc, Boc) lahustati etanoolis, millele on lisatud 5% vett (ruumala järgi), seejärel lisati 1 ekv. 2-metüültoatseetaldehüüdi dimetüülatsetaali. Katalüsaatorina kasutati TFA-d (0,1 mooli ühe mooli atsetaali kohta Fmoc-NHNH₂-ga reaktsiooni korral ja 0,005 mooli Boc-NHNH₂ kasutamisel). Reaktsioonisegu keedeti püstjahutiga, reaktsiooni kulgemist jälgiti TLC abil (vooluti EA/PE ½ segu). Pärast

reaktsiooni lõppemist reaktsioonisegu kontsentreeriti rotaatoraurusti abil ja vakumeeriti sügavas vaakumis.

(1) (2-metüültio)etanaali N-fluorenüülmetüüloksükarbonüülhüdrasoon: Saagis 99%.

TMR (DMSO- d_6): ^1H δ = 2.02 (s, 3H, CH_3); 3.22 (d, 2H, CH_2); 4.26 (t, 1H, $\text{CH}(\text{Fmoc})$); 4.45 (d, 2H; CH_2 (Fmoc)); 7.28-7.45 (m, 5H, Ar(H)); 7.70 (d, 2H, Ar(H)); 7.84 (d, 2H, Ar(H)). ^{13}C δ = 13.9; 34.1; 46.5; 65.6; 119.7; 124.9; 126.8; 127.4; 140.6; 143.4; 153.2. IP: 3231.0; 3060.9; 2949.3; 2916.8; 1709.9; 1652.0; 1618.3; 1547.0; 1449.0; 1340.6; 1255.8; 1189.6; 1082.2; 1030.0; 980.5; 758.6; 739.2; 697.4. HRMS: m/z $\text{C}_{18}\text{SO}_2\text{N}_2\text{H}_{18}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ jaoks arvutatud: 327.11617, määratud: 327.11610. Elementanalüüs: teoreetiline koostis % $\text{C}_{18}\text{SO}_2\text{N}_2\text{H}_{18}$ jaoks: C, 66.23; S, 9.82; N, 8.58; H, 5.56. Eksperimentaalne: C, 66.24; S, 9.63; N, 8.41; H, 5.63.

St: 165-169 °C.

(2) (2-metüültio)etanaali N-tert-butüüloksükarbonüülhüdrasoon: Saagis 99%.

TMR (CDCl_3): ^1H δ = 1.49 (s, 9H, 3x CH_3); 2.05 (s, 3H, CH_3); 3.24 (d, 2H, CH_2); 6.19 (br.s, 1H, NH); 8.86 (t, 1H, $-\text{CH}=\text{N}-$).

^{13}C δ = 14.6; 28.3; 34.8; 81.8; 142.9; 152.9. IP: 3222.6; 2979.1; 1706.4; 1534.0; 1367.9; 1273.7; 1251.3; 1156.0; 1082.6; 1044.8; 1017.8; 843.0; 769.2; 722.1.

HRMS: m/z $\text{C}_8\text{SO}_2\text{N}_2\text{H}_{16}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ jaoks arvutatud: 205.10052, määratud: 205.10050
Elementanalüüs: teoreetiline koostis $\text{C}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{SH}_{16}$ jaoks: C, 47.03; S, 15.70; N, 13.71; H, 7.89. Eksperimentaalne: C, 47.01; S, 15.83; N, 13.44; H, 7.70.

St: 77-82 °C.

4) Üldine hüdrasoonide redutseerimise meetod: 1 ekv. hüdrasooni lahustati THF-s, segu jahutati jäävannis ning lisati 3 ekv. NaBH_3CN ning 3 ekv. CH_3COOH . Reaktsiooni kulgemist jälgiti TLC abil.

Reaktsiooni lõppemisel kontsentreeriti reaktsioonisegu rotaatoraurusti abil, jääk lahjendati EA-ga, neutraliseeriti 1 M NaHCO_3 lahusega, pesti 2 korda H_2O ning küllastunud NaCl lahusega. EA-lahus kuivatati vv. Na_2SO_4 -ga, kuivatav aine eemaldati filtreerimise teel ning filtraat kontsentreeriti rotaatoraurusti abil. Pärast redutseerimist tekkinud booriga kompleksside (Calabretta, 1991) lagundamiseks kasutati etanoolis keetmist püstjahutiga. Pärast etanooli kokkuaurustamist puhastati toorsegu kolonnkromatograafiliselt silikageelil.

(3) N-Fmoc-N'-(2-metüültio)etüülhüdrasiin: Saagis 99%. TMR (CDCl_3) ^1H δ = 2.09

(s, 3H, CH₃); 2.58 (t, 2H, CH₂); 3.04 (s, 2H, CH₂); 4.20 (t, 2H, CH (Fmoc) + NH); 4.46 (d, 2H, CH₂ (Fmoc)); 6.50 (br.s, 1H, NH); 7.26-7.42 (m), 7.57 (d), 7.76 (q) (8H, Ar(H) (Fmoc)).

¹³C δ = 15.5; 32.5; 47.5; 50.1; 67.2; 120.2; 125.2; 127.3; 128.0; 141.6; 143.9; 157.5.

IP: 3301.1; 3221.8; 3099.4; 2936.7; 1693.6; 1553.8; 1485.2; 1451.9; 1260.8; 1232.0; 1147.1; 1101.9; 1031.1; 1007.3; 911.6; 884.8; 846.0; 756.2; 737.3; 646.1; 620.3

LRMS: m/z C₁₈SO₂N₂H₂₀ [M + H]⁺ jaoks arvutatud: 329.1, määratud: 329.0.

HRMS: m/z C₁₈SO₂N₂H₂₀ [M + H]⁺ jaoks arvutatud: 329.13183, määratud: 329.13153.

Elementanalüüs: teoreetiline elementide % C₁₈SO₂N₂H₂₀ jaoks: C, 65.83; S, 9.76;

N, 8.53; H, 6.14. määratud: C, 65.86; S, 9.75; N, 8.46; H, 6.17.

St: 165-169 °C

(4) N-Boc-N'-(2-metüültio)etüülhüdraasiin: Saagis 60%. TMR (CDCl₃): ¹H δ = 1.46 (s, 9H, 3x CH₃); 2.12 (s, 3H, CH₃); 2.62 (t, 2H, CH₂); 3.05 (t, 2H, CH₂); 4.31 (br.s, 1H, NH); 6.78 (br.s, 1H, NH). ¹³C δ = 15.3; 28.4; 32.3; 50.2; 80.4; 156.8. IP: 3307.3; 2975.8; 2917.8; 1700.0; 1453.9; 1391.4; 1366.1; 1275.1; 1253.0; 1150.7; 1047.3; 1020.1; 869.1; 774.0. LRMS: Leitud m/z (M + Na⁺)⁺: 229.0. LRMS: m/z C₈N₂O₂SH₁₈ [M + H]⁺ jaoks arvutatud: 207.1, määratud: 207.0.

HRMS: m/z C₈N₂O₂SH₁₈ [M + H]⁺ jaoks arvutatud: 207.11617, määratud: 207.11595.

Elementanalüüs: teoreetiline elementide % C₈N₂O₂SH₁₈ jaoks: C, 46.57; S, 15.54; N, 13.58; H, 8.79, määratud: C, 46.68; S, 15.59; N, 13.64; H, 8.72.

St: 42-45 °C.

5) Asa-aminohapete prekursorite ühe-poti süntees lähtudes atsetaalidest:

1 ekv. PG-NHNH₂ (PG= Fmoc, Boc) lahustati etanoolis, millele on lisatud 5% vett (ruumala järgi), seejärel lisati 1 ekv. 2-metüültioatsetaldehüüdi dimetüülatsetaali. Katalüsaatorina kasutati TFA-d (0,1 mooli ühe mooli atsetaali kohta Fmoc-NHNH₂-ga reaktsiooni korral ja 0,005 mooli Boc-NHNH₂ kasutamisel). Reaktsioonisegu keedeti püstjahutiga, reaktsiooni kulgemist jälgiti TLC abil (vooluti EA/PE ½ segu). Pärast reaktsiooni lõppemist jahutati segu toatemperatuurini ning lisati 3 ekv. NaBH₃CN ning 3 ekv. CH₃COOH. Reaktsiooni kulgemist jälgiti TLC abil.

Reaktsiooni lõppemisel segu neutraliseeriti 1 M NaHCO₃ lahusega ning segu kuumutati keemiseni ja keedeti paari tunni jooksul. Etanool eraldati rotaatoraurusti abil, jääk lahjendati EA-ga, pesti 2 korda H₂O ning küllastunud NaCl lahusega. EA-

lahus kuivatati vv. Na₂SO₄-ga, kuivatav aine eemaldati filtrimise teel ning filtraat kontsentreeriti rotaatoraurusti abil. Produkt puhastati kolonnkromatograafiliselt silikageelil.

6) Üldine aldehüüdide redutseerimise meetod: 1 ekv. aldehüüdi lahustati MeOH-s ning lisati jäävannil 1 ekv. NaBH₄. Reaktsiooni kulgemist jälgiti TLC abil. Pärast reaktsiooni lõppu hapestati reaktsioonisegu 1 M HCl lahusega ning metanool aurustati rotaatoraurusti abil (N-Z-indool-3-aldehüüdi redutseerimise korral eelnevalt neutraliseeriti hape NaHCO₃ lahusega). Jääk lahjendati EA-ga, pesti 2 korda H₂O ning küllastunud NaCl lahusega. Veefaasi ekstraheeriti 3 korda EA-ga, ekstraktid ühendati, pesti küllastunud NaCl lahusega ning ühendati orgaanilise faasiga. Orgaaniline faas kuivatati vv. Na₂SO₄-ga. EA eraldati aurustamisel, saadud toorprodukti kasutati puhastamata kujul järgnevates etappides.

(8) 4-metoksübensüülalkohol (Kochi, 1953). Saagis 94%. TMR (CDCl₃): ¹H δ = 2.53 (br.s, 1H); 3.77 (s.; 3H); 4.54 (s.; 2H); 6.85 (d.; 2H); 7.24 (d.; 2H). ¹³C TMR (CDCl₃) δ = 55.0; 64.3; 113.7; 128.4; 133.3; 158.9. IP: 3345.7; 2935.1; 2835.9; 1611.1; 1586.0; 1511.8; 1463.3; 1301.3; 1243.9; 1173.2; 1109.7; 1030.4; 1005.4; 814.7; 752.9; 707.6.

(15) 4-(*tert*-butüüloksükarbonüüloksü)bensüülalkohol (Ito, 2000). Saagis: 98%. TMR (CDCl₃): ¹H δ = 1.56 (s., 9H); 3.08. (s, 1H); 4.54 (s., 2H); 7.12 (d, 2H); 7.30 (d, 2H). ¹³C δ = 27.7; 64.3; 83.5; 121.2; 127.9; 138.6; 150.4; 152.0. IP: 3348.4; 2981.0; 1754.3; 1607.3; 1508.3; 1475.2; 1458.0; 1419.0; 1394.8; 1370.0; 1273.0; 1255.3; 1217.0; 1141.1; 1046.4; 1013.7; 893.1; 832.3; 781.2; 728.6.

(16) ((4-bensüüloksü)fenüül) metanool (Brun, 2002). Saagis 92%. IP: 3322.5, 2921.0, 1609.6, 1511.0, 1454.0, 1381.7, 1298.0, 1240.7, 1172.8, 1111.0, 1001.7, 807.7, 737.1, 694.2.

TMR (CDCl₃): ¹H δ = 2.01 (s, 1H, OH), 4.55 (s, 2H, CH₂(OH)), 5.03 (s, 2H, -CH₂-O-), 6.94 (t, 2H, Ar(H)), 7.22-7.40 (m, 7H, Ar(H)).

¹³C δ = 64.9, 70.1, 115.0, 127.4, 128.6, 128.6, 133.5, 137.0, 158.4.

(24) *N*-bensüüloksükarbonüül-3-indolüülmetanool (Takeshi, 2002). Saagis 79%. TMR (CDCl₃): ¹H δ = 4.15 (s, 1H); 4.78 (s, 2H); 5.38 (s, 2H); 7.31-7.68 (m, 10H); 8.25 (d, 1H). ¹³C δ = 56.3; 68.3; 114.9; 119.1; 121.3; 122.6; 122.7; 124.5; 128.0; 128.3; 128.3; 128.9; 134.8; 135.4; 150.4. IP: 3377.8; 2871.3; 1729.9; 1608.1; 1452.0; 1396.1; 1349.6; 1304.6; 1243.7; 1219.7; 1123.2; 1084.0; 1041.9; 1003.1; 909.4; 812.2; 743.1; 696.0; 654.1.

7) Üldine Boc-rühmaga kaitsmise meetod: 1 ekv. kaitsmist vajavat ühendit lahustati kloroformis, lisati 1,05 ekv. Boc₂O, ning 0,1 ekv. DMAP. Reaktsiooni jälgiti TLC abil. Reaktsiooni lõppemisel segu lahjendati EA-ga, pesti 3 korda veega ja küllastunud NaCl lahusega. Veefaasi ekstraheeriti 3 korda EA-ga, ekstraktid ühendati, pesti küllastunud NaCl lahusega ning ühendati orgaanilise lahusega. Orgaaniline faas kuivatati vv. Na₂SO₄-ga. EA eraldati aurutamise, saadud toorprodukti kasutati puhastamata kujul järgnevatel etappidel.

(13) 4-(*tert*-butüüloksükarbonüüloksü)bensaldehüüd (4-O-Boc-bensaldehüüd) (Ito, 2000). Saagis 97%. TMR (CDCl₃): ¹H δ = 1.56 (s., 9H); 7.35 (d., 2H); 7.89 (t., 2H); 9.97 (s., 1H). ¹³C δ = 27.6; 84.3; 121.8; 131.1; 133.9; 150.9; 155.7; 190.7. IP: 2934.5; 1755.7; 1700.0; 1600.3; 1370.2; 1271.7; 1256.3; 1217.2; 1138.6; 1012.4; 892.0; 835.5; 778.5.

(8) Üldine Z-rühmaga kaitsmise meetod: 1 ekv. kaitsmist vajavat ühendit lahustati DCM-s, jahutati jäävannis, lisati 2 ekv. DiPEA. Seejärel lisati tilkhaaval 1,05 ekv. Z-Cl. Reaktsiooni jälgiti TLC abil. Reaktsiooni lõppemisel DCM eraldati rotaatoraurusti abil, jääk lahustati EA-s, pesti 3 korda veega ja küllastunud NaCl lahusega. Veefaasi ekstraheeriti 3 korda EA-ga, ekstraktid ühendati, pesti küllastunud NaCl lahusega ning ühendati orgaanilise lahusega. Orgaaniline faas kuivatati vv. Na₂SO₄-ga. EA eraldati aurustamisega, saadud toorprodukti kasutati järgmistel etappidel puhastamata kujul.

(23) *N*-bensüüloksükarbonüülindool-3-aldehüüd (Takeda, 1980). Saagis 99%. TMR (CDCl₃): ¹H δ = 5.44 (s, 2H); 7.23-7.50 (m, 8H); 8.09-8.25 (m., 3H); 9.98 (s., 1H). ¹³C δ = 69.8; 115.1; 122.1; 122.2; 124.8; 126.0; 126.3; 128.7; 128.9; 129.1; 134.3; 135.85; 135.9; 150.0; 185.5.

IP: 3033.9; 2818.3; 1746.4; 1672.9; 1607.8; 1550.6; 1480.0; 1450.1; 1398.5; 1344.6; 1307.5; 1258.6; 1215.0; 1163.9; 1127.9; 1087.0; 1028.0; 1015.9; 944.3; 909.3; 744.2; 696.3

9) Üldine Bn- rühmaga kaitsmise meetod: 1 ekv. kaitsmist vajavat ühendit lahustati ACN-s, lisati 3 ekv. DiPEA ja koheselt lisati tilkhaaval 1,05 ekv. Bn-Br. Segu keedeti püstjahutiga ning jälgiti reaktsiooni kulgemist TLC abil. Reaktsiooni lõppemisel ACN eraldati rotaatoraurusti abil, jääk lahustati EA-s, pesti 3 korda veega ja küllastunud NaCl lahusega. Veefaasi ekstraheeriti 3 korda EA-ga, ekstraktid ühendati, pesti küllastunud NaCl lahusega ning ühendati orgaanilise lahusega. Orgaaniline faas kuivatati vv. Na₂SO₄-ga. EA eraldati aurustamisega, saadud toorprodukti kasutati järgmistes etappides puhastamata kujul.

(14) 4-bensoksübensaldehüüd (Ruenitz, 1989). Saagis 99%. IP: 3056.1, 2829.4, 2745.0, 1685.0, 1598.2, 1573.6, 1508.4, 1461.4, 1452.0, 1425.2, 1394.4, 1320.5, 1300.8, 1257.6, 1213.0, 1162.2, 1110.0, 1077.5, 1018.0, 865.1, 828.9, 788.2, 734.4, 696.0, 653.9, 625.0.

TMR (CDCl₃): ¹H δ = 5,08 (s, 2H, CH₂), 7,03 (q, 2H, Ar(H)), 7,33-7,40 (m, 5H, Ar(H)), 7,78 (kvint, 2H, Ar(H)), 9.82 (s, 1H, COH).

¹³C δ = 70.2, 115.2, 116.1, 127.4, 128.2, 128.7, 130.1, 131.9, 132.3, 136.0, 163.8, 190.7.

10) Indooli formüülimise (Indool-3-aldehüüdi süntees) meetod (James, 1963): 9 ml DMF jahutati kolvis jäävannil, seejärel lisati tilkhaaval 0,5 tunni jooksul 4,4 g POCl₃. Selle tulemusena moodustus roosakas lahus (Vilsmeieri kloroimiiniumkompleks). Seejärel lisati 0,4 tunni jooksul 3 g indooli lahus 3 ml DMF-s. Reaktsioonisegu segati 0,5 tunni jooksul jäävannil ning seejärel soojendati õlivannil temperatuurini 35 °C. Reaktsioonisegu segati temperatuuril 35 °C 2 tundi. Reaktsiooni ulatust kontrolliti TLC abil, kasutades voolutina EA/PE ½ segu. Saadud kollane siirupitaoline reaktsioonisegu valati jääle, lisati umbes 100 ml 2 M NaOH lahust ning kuumutati keemiseni. Selle tulemusena alguses väga hägune lahus muutus läbipaistvaks. Saadud lahus jahutati jäävannil ning jäeti kristallumiseks ööseks külmikusse. Indool-3-aldehüüd kristallus vesilahusest kollakate nõelakujuliste kristallidena. Indool-3-aldehüüd eraldati filtrimise teel, ainet pesti jääkülma veega

NaOH eemaldamiseks ning kuivatati. Saadi 3,188 g indool-3-aldehüüdi, mis moodustas 86% teoreetilisest.

(22) Indool-3-aldehüüd. Saagis 86%. TMR (d^6 -DMSO): ^1H δ = 7.31 (t.), 7.59 (s.), 8.26 (q.) (5H); 10.05 (s., 1H); 11.27 (br.s., 1H). ^{13}C δ = 112.5; 118.3; 120.9; 122.1; 123.5; 124.3; 137.2; 138.2; 185.0. St: 194-197 °C (kirj. 196-197 °C), (James, 1963).

11) Üldine alkoholidest alküülhalogeniidide sünteesi meetod:

1 ekv. alkoholi lahustati Ar-atmosfääris jäävannil 3 ml veevabas DCM-s. Lisati 1-2 ekv. TEA ning seejärel lisati tilkhaaval 0,77 ekv. PBr_3 lahust DCM-s. Reaktsioonisegu segati 1-2 tunni jooksul. Reaktsiooni lõppemisel lahjendati reaktsioonisegu kloroformiga, lisati küllastunud NaHCO_3 lahus. Saadud segu ekstraheeriti 3 korda kloroformiga. Kloroformilahust pesti küllastunud NaCl lahusega. CHCl_3 -lahus kuivatati vv. Na_2SO_4 -ga ning kloroform eraldati roteerimisega. Saadud halogeniid sobib alküülimise reaktsioonide teostamiseks, vajadusel on võimalik produkti puhastada kolonnkromatograafiliselt silikageelil.

(9) 4-metoksübensüülbromiid (Kornblum, 1955). Saagis 71%. TMR (CDCl_3): ^1H δ = 3.76 (s.; 3H); 4.47 (s.; 2H); 6.83 (d.; 2H); 7.29 (d.; 2H). ^{13}C δ = 33.9; 55.1; 114.0; 130.2; 159.5. IP: 3025.4; 2957.7; 2835.8; 1608.2; 1583.5; 1511.8; 1462.0; 1302.3; 1249.4; 1229.6; 1174.6; 1029.9; 830.0; 680.0; 594.0.

(17) (1-*tert*-butüüloksükarbonüüloksü)-4-bromometüülbenseen (Dourlat, 2007). Saagis 30%. TMR (CDCl_3): ^1H δ = 1.55 (s, 9H); 4.46 (s, 2H); 7.15 (d, 2H); 7.38 (d, 2H). ^{13}C δ = 27.8, 32.6, 83.7, 121.7; 130.2, 135.3, 151.1, 151.7. IP: 2980.6; 1754.0; 1608.9; 1508.3; 1394.5; 1369.7; 1272.0; 1255.4; 1220.5; 1139.9; 1017.5; 893.0; 837.4; 780.0; 718.1; 671.0; 602.9.

(18) (1-bensoksü)-4-bromometüülbenseen (Brun, 2002). Saagis 34%. TMR (CDCl_3): ^1H δ = 4,40 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Br}$); 4,96 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$); 6.87 (d, 2H, Ar(H)); 7,22-7,35 (m, 6H, Ar(H)). ^{13}C δ = 33,8; 70,0; 115,1; 127,3; 127,9; 128,5; 130,2; 130,4; 136,7; 158,8.

(25) 1-bensüüloksükarbonüül-3-bromometüülindool (Takeshi, 2002). Saagis 87%. TMR (CDCl_3): ^1H δ = 4.55 (s, 2H); 5.37 (s, 2H); 7.26-7.46 (m., 7H); 7.74-7.78 (m, 2H); 8.15 (d, 1H). ^{13}C δ = 24.1; 69.0; 115.5; 118.2; 119.5; 123.3; 124.6; 125.4; 128.6;

128.8; 135.0; 135.9; 150.5. IP: 3108.4; 2852.4; 1704,5; 1605.9; 1530.1; 1346.0; 1196.8; 1104.5; 1007.5; 849.5; 814.9; 738.4; 679.0.

12) N-Fmoc-, N-Boc-ja N-Z-hüdrasiinide erinevates tingimustes bensüülimise üldine meetod:

Täpsed tingimused: solvent, temperatuur, reagentide vahekord jne. vt. (**Tabel 1-3**): 1-4 ekv. *N*-kaitstud hüdrasiini lahustati solvendis (vt. **Tabel 1-3** ja **Skeem 15**) (0,1- 2,2 M lahus), temperatuuri hoitakse toatemperatuuri ja 90 °C vahel. Mõnedes katsetes hüdrasiini lahusele lisati ka 1 ekv. alust (DiPEA; 2,4,6-trimetüülpüridiin).

Seejärel lisati tilkhaaval 1 ekv. bensüülbromiidi ning lasti reaktsioonil toimuda 3 tundi kuni üleöö kas toatemperatuuril või 70-80 °C juures. Saadud reaktsioonisegu kontsentreeriti roteerimisega, jääk lahustati EA-s, pesti 1 M NaHCO₃ lahuse, 3 korda H₂O ning küllastunud NaCl lahusega. Veefaasi ekstraheeriti 3 korda EA-ga, ühendatud ekstrakti pesti küllastunud NaCl lahusega ning ühendati orgaanilise faasiga. Orgaaniline faas kuivatati vv. Na₂SO₄ abil, Na₂SO₄ eemaldati filtrimise teel ning lahus kontsentreeriti roteerimisega. Saadud jääk puhastati kolonnkromatograafiliselt silikageelil, kasutades voolutina EA/PE 1/2 segu.

(5) N-Boc-N'-bensüülhüdrasiin (Melendez, 2004). Saagis 79%.

TMR (CDCl₃): ¹H δ = 1.45 (s.; 9H; 3xCH₃(Boc)); 3.95 (s.; 2H; -NH-CH₂); 4.14 (br.s.; 1H; NH); 6.57 (br.s.; 1H; NH); 7.26-7.33 (m.; 5H; Ar(H)). ¹³C δ = 28.38; 55.81; 80.37; 127.42; 128.41; 129.02; 137.75; 156.74. IP (cm⁻¹): 3303.4; 2976.5; 1704.1; 1453.6; 1391.5; 1366.1; 1278.2; 1251.7; 1151.2; 1046.4; 1019; 873.8; 736.1; 697.7. HRMS: C₁₂N₂O₂H₁₈, protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 223.14410, määratud 223.14401.

(6) N-Fmoc-N'-bensüülhüdrasiin (Boeglin, 2005). Saagis 68%. TMR (CDCl₃): ¹H δ = 3.97 (s., 3H; -NH-CH₂ + NH); 4.20 (t., 2H; CH(Fmoc)); 4.44 (d, 2H; CH₂(Fmoc)); 6.37 (br.s., 1H; NH); 7.25-7.76 (m, 8H; Ar(H)). ¹³C δ = 47.4; 55.8; 67.1; 120.1; 125.1; 127.2; 127.7; 127.9; 128.6; 129.1; 141.5; 143.8; 157.3.

IP (cm⁻¹): 3316.5; 1685.6; 1500.4; 1271.9; 1106.1; 735.8. HRMS: C₂₂N₂O₂H₂₀, protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 345.15975, määratud: 345.15936.

(7) N-Z-N'-bensüülhüdrasiin (Mäeorg, 1999). Saagis 64%.

TMR (CDCl₃): ¹H δ = 4.04 (s., 2H; -NH-CH₂); 4.26 (br.s., 1H; NH); 5.20 (s., 2H;

CH₂(Z)); 6.90 (br.s., 1H; NH); 7.40 (d., 10H; Ar(H)). ¹³C δ = 55.6; 67.0; 127.5; 128.1; 128.2; 128.4; 128.5; 128.9; 136.1; 137.4; 157.2. IP: 3299.5; 3030.6; 1718.5; 1495.7; 1453.5; 1264.4; 1151.4; 1028.1; 908.2; 848.6; 737.0; 696.3. HRMS: C₁₅O₂N₂H₁₆, protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 257.12845, määratud 257.12826.

13) Üldine kaitstud hüdrasiinide alküülimise meetod.

3-4 ekv. Fmoc-; Boc- või Z-hüdrasiini lahustati ACN-s (0,1 M lahus) ning kuumutati püstjahutiga keemiseni. Keevale lahusele lisati 1 ekv. 2,4,6-trimetüülpüridiini ning seejärel lisati tilkhaaval 1 ekv. vastava halogeniidi lahust ACN-s. Reaktsioonisegu keedeti üle öö.

Reaktsioonisegu kontsentreeriti roteerimisega, lahjendati EA-ga, pesti 1 M NaHCO₃ lahusega, 2 korda H₂O ja küllastunud NaCl lahusega. Veefaasi ekstraheeriti 3 korda EA-ga, ekstrakti pesti küllastunud NaCl lahusega ning ühendati orgaanilise fraktsiooniga. EA-lahus kuivatati vv. Na₂SO₄-ga, kuivatav aine eemaldati filtrimise teel. Saadud filtraat kontsentreeriti roteerimisega ja vakumeeriti. Jääk puhastati kolonnkromatograafiliselt silikageelil, kasutades voolutina EA/PE ½ segu.

(10) N-Fmoc-N'-4-metoksübensüülhüdrasiin (Fmoc-NHNH-CH₂-Ph-4-OCH₃).

Saagis: 61%. TMR (CDCl₃): ¹H δ = 3.76 (s.; 3H); 3.89 (s, 2H); 4.19 (t.; 2H); 4.44 (d.; 2H); 6.47 (br.s.; 1H); 6.85 (t.; 2H); 7.18-7.41 (m.; 7H); 7.55 (d.; 2H); 7.74 (d.; 2H).

¹³C δ = 47.4; 55.3; 67.0; 114.0; 120.1; 125.1; 127.2; 127.8; 130.3; 141.4; 143.8; 157.3; 159.3. IP: 3311.6; 2916.1; 1719.1; 1611.2; 1584.8; 1511.6; 1449.6; 1372.4; 1244.6; 1153.4; 1107.7; 1034.4; 814.6; 758.4; 739.6;

HRMS: C₂₃N₂O₃H₂₀, protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 375.17032, määratud: 375.17013.

(11) N-Boc-N'-4-metoksübensüülhüdrasiin (Boc-NHNH-CH₂-Ph-4-OCH₃) (Fässler, 1996). Saagis 56%.

TMR (CDCl₃): ¹H δ = 1.46 (s.; 9H); 3.78 (s.; 3H); 3.91 (s.; 2H); 4.14 (br.s.; 1H); 6.36 (br.s.; 1H); 6.85 (d.; 2H); 7.26 (d.; 2H). ¹³C δ = 28.4; 55.3; 62.5; 80.5; 114.0; 129.7; 130.3; 156.8; 159.2. IP: 3314.2; 2975.9; 1709.0; 1612.1; 1512.3; 1457.1; 1366.4; 1278.5; 1247.6; 1154.1; 1035.4; 814.5. HRMS: C₁₃O₃N₂H₁₈, protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 253.15467, määratud: 253.15465.

(12) N-Z-N'-4-metoksübensüülhüdrasiin (Z-NHNH-CH₂-Ph-4-OCH₃). Saagis 40%.
TMR (CDCl₃): ¹H δ = 3.75 (s.; 3H); 3.90 (s.; 2H); 5.11 (s.; 2H); 6.57 (br.s.; 1H); 6.81 (d.; 2H); 7.21 (d, 2H), 7.34 (d, 5H). ¹³C δ = 55,2; 67,0; 113,9; 128,1; 128,2; 128,5; 129,4; 130,2; 136,2; 157,2; 159,1. IP: 3267.9; 2933.5; 2834.2; 1715.2; 1610.6; 1585.2; 1510.3; 1453.7; 1301.6; 1240.9; 1173.5; 1149.7; 1031.0; 821.5; 737.7; 695.3. HRMS: C₁₆O₃N₂H₁₈, protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 287.13902, määratud: 287.13900.

(19) N-Fmoc-N'-((4-*tert*-butüüloksükarbonüül)oksü)bensüül)hüdrasiin. Saagis 36%.
TMR (CDCl₃): ¹H δ = 1.62 (s., 9H); 4.01 (s., 2H); 4.26 (t.; 1H); 4.50 (d, 2H); 6.43 (br.s, 1H); 7.20-7.82 (m., 12H). ¹³C δ = 27.8; 47.4; 55.1; 67.0; 83.6; 120.1; 121.4; 125.1; 127.2; 127.9; 130.0; 135.1; 141.5; 143.8; 150.7; 152.0; 157.3. IP: 3358.3; 2983.4; 1749.4; 1691.6; 1509.3; 1470.3; 1450.5; 1370.1; 1257.4; 1222.1; 1143.8; 1105.9; 1086.2; 1043.7; 1020.0; 982.7; 895.7; 780.1; 755.9; 738.2. HRMS: C₂₇O₅N₂H₂₈, protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 461.20710, määratud: 461.20688.

(20) N-Fmoc-N'-4-(bensüül)oksü)bensüül)hüdrasiin. Saagis 34%.
TMR (CDCl₃): ¹H δ = 3,51 (br.s, 1H, NH), 3,90 (s, 2H, CH₂), 4,45 (d, 2H, CH₂ (Fmoc)), 5,02 (s, 2H, -O-CH₂-Ar), 6,37 (br.s, 1H, NH), 6,93 (t, 2H, Ar(H)), 7,32 (m, 12H, Ar(H)), 7,55 (d, 2H, Ar(H)), 7,74 (d, 2H, Ar(H)).
¹³C δ = 47,3; 55,2; 67,0; 70,1; 115,0; 120,0; 125,0; 127,1; 127,4; 127,8; 128,0; 128,6; 129,7; 130,3; 137,1; 141,4; 143,7; 157,2; 158,4.
HRMS: C₂₉H₂₆N₂O₃, protoneeritud molekuli [M + H]⁺ m/z arvutatud: 451.20162, määratud: 451.20181.

(21) N-Boc-N'-4-(bensüül)oksü)bensüül)hüdrasiin. Saagis 48%.
TMR (CDCl₃): ¹H δ = 1,45 (s, 9H; x3CH₃ (Boc)), 3,92 (s, 2H, -CH₂-NH-), 5,03 (s, 2H, -CH₂-O-), 6,51 (br.s, 1H, NH), 6,91 (t, 2H, Ar(H)), 7,30 (m, 7H, Ar(H)).
¹³C δ = 28,3; 55,3; 70,1; 80,8; 114,9; 127,4; 127,9; 128,6; 129,2; 130,4; 137,0; 156,5; 158,5. HRMS: C₁₉H₂₄N₂O₃, [M + H]⁺ m/z arvutatud: 351.16791, määratud: 351.16798.

(26) N-Fmoc-N'-((N''-bensüül)oksükarbonüül-3-metüülindolüül)hüdrasiin. Saagis 43%. TMR (CDCl₃): ¹H δ = 3.61 (t, 1H); 4.16 (kvint., 3H); 4.49 (d, 2H); 5.38 (s, 2H);

7.25-7.41 (m); 7.72 (d), 8.18 (d) (16H). ^{13}C δ = 46.7; 47.4; 67.2; 68.9; 115.4; 119.8; 120.1; 123.2; 124.5; 125.1; 127.2; 127.9; 128.6; 128.9; 130.1; 135.2; 136.0; 141.5; 143.8; 150.8; 157.3. HRMS: $\text{C}_{32}\text{N}_3\text{O}_4\text{H}_{27}$, protoneeritud molekuli $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z arvutatud: 518.20743, määratud: 518.20717.

(27) N-Boc-N'-((N''-bensüüloksükarbonüül-3-metüülindolüül)hüdrasiin. Saagis 55%. TMR (CDCl_3): ^1H δ = 1.44 (s, 9H); 3.61 (t, 2H); 4.11 (s, 2H); 5.40 (s, 2H); 6.29 (br.s, 1H); 7.24-7.70 (m, 10H); 8.16 (d, 1H). ^{13}C δ = 28.4; 46.6; 68.7; 80.6; 115.3; 118.0; 119.7; 123.0; 124.2; 124.8; 128.5; 128.7; 128.8; 130.1; 135.2; 135.8; 150.7; 156.8. LRMS: $\text{C}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{H}_{25}$, protoneeritud molekuli $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z arvutatud: 396.2, määratud 396,2. HRMS: $\text{C}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{H}_{25}$, protoneeritud molekuli $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z arvutatud: 418.17373, määratud: 418.17373.

4. Tulemused ja nende arutelu

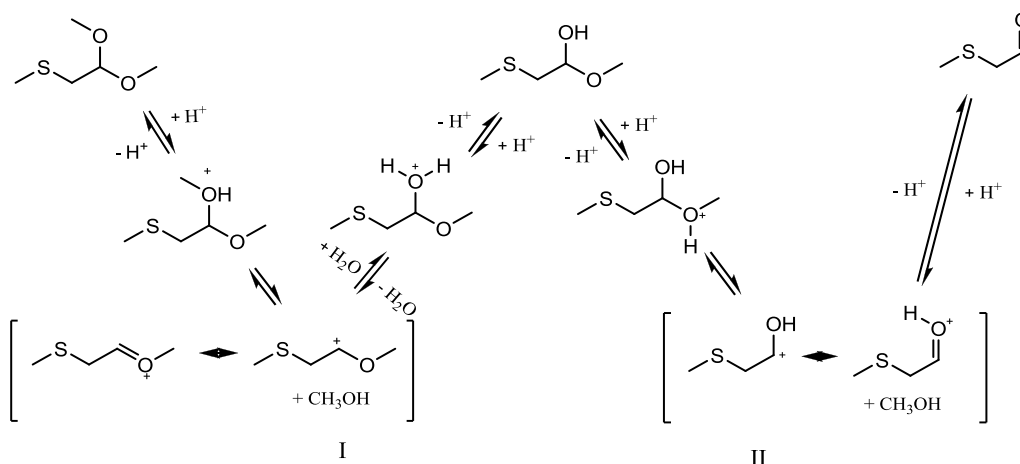
4.1 Asa-metioniini süntees atsetaalist

Erinevalt kirjanduses toodud redutseeriva amiinimise meetoditest, kus on lähtutud karbonüülühendist, võeti selles töös kasutusele atsetaalist lähtuv sünteesimeetod. Selline muudatus võimaldab redutseeriva amiinimise reaktsiooni kasutada ka nende aldehüüdide (ja ketoonide) korral, mis esinevad ainult kaitstud aldehüüdrühmaga, st atsetaali kujul. Lisaks sellele kasutati seda sünteesimeetodit nn „ühe poti“ sünteesina.

Konkreetselt sünteesiti sellel teel asa-metioniini prekursor lähtudes 2-metüültioatseetaldehüüdi dimetüülatsetaalist (vt. **3.4** meetod **4**). Kõige edukamalt õnnestus seda reaktsiooni teostada siis, kui katalüsaatoriks kasutati tugevat hapet, antud juhul TFA-d, sest äädikhappe juuresolekul (ka suuremaid koguseid kasutades) kulgesid reaktsioonid väga aeglaselt. Samas on tähtis mainida, et TFA-d ei tohi üle doseerida: nii osutus optimaalseks 0,1 mooli TFA lisamine 1 mooli atsetaali kohta selle reaktsioonil Fmoc-NHNH₂-ga ja 0,005 mooli TFA lisamine 1 mooli atsetaali kohta selle reaktsioonil Boc-NHNH₂-ga. Mainitud kogusest 2-3 korda suuremate TFA koguste lisamisel toimus Boc-rühma eemaldamine, kõrvalproduktide moodustumine ja hüdrasooni saagise vähenemine. TFA ülehulk vähendas saagist ka Fmoc-hüdrasiini kondenseerimisel 2-metüültioatseetaldehüüdi dimetüülatsetaaliga.

Nn. „ühe-poti“ sünteesimeetodi suurimaks eeliseks oli see, et puudus vaheproduktide eraldamise ja solventi vahetamise vajadus. Tähtis on märkida, et „ühe-poti“ sünteesimeetodi kasutamise korral oli Boc-rühmaga kaitstud asa-metioniini prekursori saagis peaaegu sama, mis hüdrasooni vahepealse eraldamisega toimunud sünteesil: 57%. Fmoc-kaitserühmaga prekursori sünteesimisel ilma hüdrasooni eraldamiseta oli saagis aga 52%, mis on peaaegu 2 korda madalam, võrreldes meetodiga, mis kasutas vaheühendi eraldamist ja redutseerimist THF-is. Madalamat saagist saab seletada ilmselt Fmoc-kaitstud ühendi halva lahustuvusega etanoolis.

Kuigi antud reaktsioonimehhanismi antud töös täpsemalt ei uuritud, siis võttes arvesse atsetaali ja aldehüüdi vahelist tasakaalu (**Skeem 20**), võib oletada, et hüdrasiiniga võiksid reageerida mõlemad selles tasakaalus esinevad katioonsed vormid (ained **I** ja **II**).



Skeem 20. Happe-katalüüsitud üleminekud atsetaali ja aldehüüdi vahel.

4.2 Asa-aminohapete prekursorite süntees alküülimise teel

Alküülimise puhul on põhiliseks probleemiks see, et reaktsiooni alguses moodustuv monoalküülhüdrasiin on oluliselt tugevam nukleofiil kui lähteaineks olev kaitstud hüdrasiin. Seega monoalküülhüdrasiiniga toimub teistkordne alküülimine, kus moodustub kõrvalproduktina vaadeldav dialküülitud produkt. Seega oli vajalik seda reaktsiooni optimeerida. Selleks uuriti mudelreaktsioonina hüdrasiini bensüülimist ning katsete tulemused on esitatud järgnevates tabelites (**Tabel 1-3**).

Tabel 1. Fmoc-NHNH₂ bensüülimine erinevates tingimustes

Tingimused:	Monoalküülitud hüdrasiini saagis (%):
2 ekv. FmocNHNH ₂ ; 0,6 M DMF lahus; 1 ekv. bensüülbromiidi; 70 °C ; 13 tundi.	46%
2 ekv. FmocNHNH ₂ ; 0,6 M DMF lahus; 1,5 ekv. DiPEA; 1 ekv. bensüülbromiidi; toatemperatuur; 12 tundi.	0%, toimus Fmoc-rühma eemaldumine
2 ekv. FmocNHNH ₂ ; 0,6 M DMF lahus; 1 ekv. bensüülbromiidi; toatemperatuur; 14 tundi.	26% *
2 ekv. FmocNHNH ₂ ; 0,1 M DMF lahus; 1 ekv. bensüülbromiidi; toatemperatuur; 12 tundi.	29% **
3 ekv. FmocNHNH ₂ ; 0,1 M DMF lahus; 1 ekv. bensüülbromiidi; 70 °C; 12 tundi.	43%
1,5 ekv. FmocNHNH ₂ ; 0,1 M ACN lahus; 1 ekv. bensüülbromiidi; püstjahutiga keetmine (5 tundi) .	36%

3 ekv. FmocNHNH ₂ ; 0,1 M ACN lahus; 1 ekv. bensüülbromiidi; püstjahutiga keetmine; 13 tundi.	45% ***
2 ekv. FmocNHNH ₂ ; 0,1 M CH ₃ OH lahus; 1 ekv. bensüülbromiidi; püstjahutiga keetmine 3 tundi; (seejärel toatemperatuuril 12 tundi).	21%
3,5 ekv. FmocNHNH ₂ ; 0,1 M CH ₃ OH lahus; 1 ekv. bensüülkloriidi; püstjahutiga keetmine; 2 tundi.	14%
4 ekv. FmocNHNH ₂ ; 0,1 M EtOH lahus; 1 ekv. bensüülbromiidi (tilkhaaval lahustatud 0,5 ml ACN-s); püstjahutiga keetmine; 14 tundi.	61%
3 ekv. Fmoc-NHNH ₂ ; 0,1 M ACN lahus; 1 ekv. 2,4,6-trimetüülpüridiini; 1 ekv. bensüülbromiidi; püstjahutiga keetmine; 6 tundi.	68%

*dibensüülitud produkti saagis oli 60%

**dibensüülitud produkti saagis oli 34%

***dibensüülitud produkti saagis oli 40%

Tabel 2. Boc-NHNH₂ bensüülimine erinevates tingimustes

Tingimused:	Monoalküülitud hüdrasiini saagis (%):
1 ekv. BocNHNH ₂ ; 1 ekv. bensüülbromiidi; 0,75 M ACN lahus; püstjahutiga keetmine; 4 tundi.	13%
2 ekv. BocNHNH ₂ ; 1 ekv. bensüülbromiidi; 0,75 M NMP lahus; toatemperatuuril; 12 tundi.	14%
3,4 ekv. BocNHNH ₂ ; 1 ekv. bensüülbromiidi; 2,3 M DMF lahus; 70 °C; 5 tundi.	63%
3 ekv. BocNHNH ₂ ; 1 ekv. bensüülbromiidi; 0,1 M DMF lahus; 70 °C; 11 tundi.	70%
3 ekv. BocNHNH ₂ ; 1 ekv. bensüülbromiidi; 0,1 M CH ₃ OH lahus; püstjahutiga keetmine; 5 tundi.	11%
4 ekv. BocNHNH ₂ ; 1 ekv. bensüülbromiidi; 0,1 M EtOH lahus; püstjahutiga keetmine; 5 tundi.	55%
4 ekv. BocNHNH ₂ ; 1 ekv. bensüülbromiidi; 0,1 M ACN lahus; 1,3 ekv. 2,4,6-trimetüülpüridiini; püstjahutiga keetmine; 13 tundi.	79%

Tabel 3. Z-NHNH₂ bensüülimine

Tingimused:	Monoalküülitud hüdrasiini saagis (%):
3 ekv. ZNHNH ₂ ; 1 ekv.; bensüülbromiidi; 0,1 M ACN lahus; püstjahutiga keetmine; 6 tundi.	64%

Saadud andmetest saab järeldada järgmist.

Väikses ülehulgas või ilma ühehulgata kasutatud karbasaadi korral oli monoalküülitud produkti saagis madal või keskpärane põhiliselt dialküülitud produkti moodustumise tõttu, sest reaktsioonisegus oli üsnagi suur monoalküülitud hüdrasiini kontsentratsioon, mis eelistatult reageeris edasi. Samuti soodustas dialküülitud hüdrasiini moodustumist ka reaktsiooni teostamine toatemperatuuril. Põhjuseks saab tuua seda, et monoalküülhüdrasiin on tugevam nukleofiil ja reageerib halogeniidiga palju kiiremini. Toatemperatuuril karbasaadi enda reaktsioon halogeniidiga on suhteliselt aeglane.

Solvent mängib alküülimise reaktsioonis väga olulist rolli. Tavaliselt sobivad reaktsiooniks polaarsed aprotoonsed solvendid, mis ei solvateeri niigi suhteliselt nõrga nukleofiili, milleks on hüdrasiin. Samas on aga alküülhüdrasiinide sünteesiks võimalik kasutada solvendina ka etanooli. Etanooli kasutamine aitab oluliselt vähendada hüdrasiini polüalküülimist (Kost, 1963). Etanooli kasutati solvendina ka selles töös, mistõttu Fmoc-NHNH-CH₂-Ph saagis oli 61% ja Boc-NHNH-CH₂-Ph saagis oli 55%. Huvitav on märkida, et etanooli asendamisel metanooliga ja ilma ülejäänud tingimusi muutmata olid monoalküülitud hüdrasiinide saagised umbes 13-21% vahemikus. Võib oletada, et hüdrasiini polüalküülimist takistab etanoolis sisalduv vesi. Samuti võis metanoolis toimuda ka ulatuslikum halogeniidi reaktsioon solvendiga.

Parimaid tulemusi saadi keevas atsetonitriilis, kasutades seejuures 3-4 kordset kaitstud hüdrasiini ülehulka ning lisades 1-1.3 ekv. 2,4,6-trimetüülpüridiini. Nendes tingimustes olid monoalküülitud produkti saagised Fmoc-NHNH-CH₂-Ph puhul 68% ja Boc-NHNH-CH₂-Ph korral 79%, mis on lähedased redutseeriva amiinimise käigus saadud saagisele.

Reaktsiooniks vajalikku alust peab valima sõltuvalt hüdrasiini kaitserühma

omadustest. Seejuures sobib trimetüülpüridiin kasutamiseks erinevate kaitserühmade korral. Samas tõi aluste suhtes tundliku Fmoc-rühma puhul tertsiaarsete amiinide nagu DiPEA ja TEA kasutamine, ja seda eriti kõrgematel temperatuuridel, kaasa kaitserühma lagunemise. Viimaseid tingimusi on edukalt rakendatud ka asa-Tyr ja asa-Trp erinevaid kaitserühmi kandvate prekursorite sünteesil, kusjuures saagised jäid vahemikku 36-58%.

Asa-aminohapete alküülimise teel vajalike halogeniidide (va BnBr ja BnCl) saamiseks kasutati primaarse alkoholi reaktsiooni fosfortribromiidiga. Antud reaktsiooni korral oli aluse juuresolek erakordselt tähtis, sest ilma selleta toimus ulatuslik kaitserühmade eemaldumine HBr toimel. Kaitstud bensüülbromiidid (va 4 metoksübensüülbromiid) olid üsna ebapüsivad ning neid tuli koheselt kasutada järgnevates sünteesides.

5. Kokkuvõte

Sissejuhatuses püstitatud probleemide lahendamiseks uuriti hüdrasiinide alküülimise reaktsiooni ja meetodeid, mis võimaldavad rakendada atsetaale hüdrasoonide ja hüdrasiinide sünteesis.

Esiteks, teostati põhjalik hüdrasiinide alküülimise reaktsiooni uurimine, mille tulemusena määrati optimaalsed reaktsiooni tingimused. Otsene alküülimine võimaldas sünteesida asa-aminohapete prekursoreid ühe-etapilises reaktsioonis ning vältida vesiniku ja Pd-I baseeruvate kalliste katalüsaatorite kasutamist, kui külgahelad sisaldasid aromaatsid rühmi. Seda reaktsiooni kasutades sünteesiti rida asa-Phe, asa-Tyr ja asa-Trp prekursoreid, millest mitmed ei ole varem kirjeldatud.

Alküülimise teel saadud varem kirjeldatud asa-aminohapete prekursorid:

N-Boc-*N'*-bensüülhüdrasiin; *N*-Fmoc-*N'*-bensüülhüdrasiin; *N*-Z-*N'*-bensüülhüdrasiin; *N*-Boc-*N'*-4-metoksübensüülhüdrasiin.

Alküülimise teel saadud uued asa-Tyr ja asa-Trp prekursorid:

N-Fmoc-*N'*-4-metoksübensüülhüdrasiin

N-Z-*N'*-4-metoksübensüülhüdrasiin

N-Fmoc-*N'*-((4-*tert*-butüüloksükarbonüül)oksü)bensüülhüdrasiin

N-Fmoc-*N'*-(4-(bensüül)oksü)bensüülhüdrasiin

N-Boc-*N'*-(4-(bensüül)oksü)bensüülhüdrasiin

N-Fmoc-*N'*-((*N'*-bensüül)oksükarbonüül-3-metüülindolüül)hüdrasiin

N-Boc-*N'*-((*N'*-bensüül)oksükarbonüül-3-metüülindolüül)hüdrasiin

Teiseks, töötati välja mugav „ühe-poti“ meetod asa-aminohapete prekursorite ja hüdrasoonide sünteesiks lähtudes atsetaalidest. Seda meetodit rakendades sünteesiti Fmoc- ja Boc-rühmaga kaitstud asa-metioniini prekursorid.

6. Summary

Design and optimization of synthetic methods of some aza-amino acid precursors

Master Thesis By Anton Mastitski

Firstly, alkylation reaction of protected hydrazine was studied and optimal reaction conditions for synthesis of aza-amino acid precursors via this reaction were determined. Direct alkylation of hydrazine, in comparison with reductive amination method, allowed to incorporate the side chain moiety of aza-amino acid with one reaction step, avoiding the use of hydrogen and Pd based expensive catalysts in the case of aza-amino acid precursors bearing aromatic groups in their side chains. As a result of this work, several aza-Phe, aza-Tyr and aza-Trp precursors were prepared, including previously not reported compounds.

Previously reported aza-amino acid precursors synthesised via hydrazine alkylation: *N*-Boc-*N'*-benzylhydrazine; *N*-Fmoc-*N'*-benzylhydrazine; *N*-Z-*N'*-benzylhydrazine; *N*-Boc-*N'*-4-methoxybenzylhydrazine.

Previously not reported aza-Tyr and aza-trp precursors:

N-Fmoc-*N'*-4-methoxybenzylhydrazine

N-Z-*N'*-4-methoxybenzylhydrazine

N-Fmoc-*N'*-((4-*tert*-Butyloxycarbonyloxy)benzyl)hydrazine

N-Fmoc-*N'*-(4-(benzyloxy)benzyl)hydrazine

N-Boc-*N'*-(4-(benzyloxy)benzyl)hydrazine

N-Fmoc-*N'*-((*N'*'-benzyloxycarbonyl)-3-methylindolyl)hydrazine

N-Boc-*N'*-((*N'*'-benzyloxycarbonyl)-3-methylindolyl)hydrazine

Secondly, a convenient „one-pot“ method for synthesis of aza-amino acid precursors and hydrazones directly from acetals was developed. This method was used for preparation of Fmoc- and Boc-protected aza-methionine precursors, which were not described in literature.

The development of new methods contributed into chemistry of aza-peptide synthesis that is important for investigation of these compounds as drug candidates.

Tänuavaldus:

Esmalt tahan tänada oma juhendajat Jaak Järve, kes tutvustas minu jaoks ülimalt põnevat ja huvitavat teaduse maailma ning kelle asjalike nõuannete abil valmis see töö.

Tänan Tõiv Haljasorgu ja Karin Kipperit mass-spektrite mõõtmise eest ja kõiki kolleege orgaanilise keemia õppetoolist nende abi ja kasulike nõuannete eest!

Lisaks suurimad tänud minu vanematele Svetlana ja Konstantin Mastitskile, õele Juliale, vanaemale ja kõigile lähedastele inimestele toetuse ja armastuse eest, sest ilma teieta oleks see töö vaevalt valmis saanud!

Veel kord suur tänu!

Kasutatud kirjandus

- 1 Boeglin, D., Lebell, W. D. (2005), Amino Acid Scanning of Secondary Structure Suited for Solid-Phase Peptide Synthesis with Fmoc Chemistry and α -Amino Acids with Heteroatomic Side Chains. *J. Comb. Chem.*, 2005, 7, 864-878.
- 2 Zega, A. Azapeptides as pharmacological agents. *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12, 5, 589-597.
- 3 Proulx, C., Sabatino, D., Hopewell, R., Spiegel, J., Garcia Ramos, Y., Lubell, W. D. Azapeptides and their therapeutic potential. *Fut. Med. Chem.*, 2011, 3, 9, 1139–1164.
- 4 Mastitski, A., Asa-aminohapete prekursorite ja proteiinkinaas A substraadi RRASVA-analoogide süntees, Bakalaureusetöö, Tartu, 2012.
- 5 Melendez, R. E., William D. Lubell, W. D., Aza-Amino Acid Scan for Rapid Identification of Secondary Structure Based on the Application of N-Boc-Aza1-Dipeptides in Peptide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 21, 6759-6764.
- 6 Kline, G. B., Cox, S. H., A New synthesis of DL-Glutamine., *J. Org. Chem.*, 1961, 26, 1854-1856.
- 7 Dutta, A. S., Morley, J. S., Polypeptides. Part XIII. Preparation of α -aza-amino-acid (carbamic acid) derivatives and intermediates for the preparation of α -aza-peptides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1975, 1712-1720.
- 8 Freeman, N. S., Hurevich, M., Gilon, C., Synthesis of N'-substituted Ddz-hydrazines and their application in solid phase synthesis of aza-peptides., *Tetrahedron*, 2009, 65, 1737-1745.
- 9 Ragnarsson, U., Synthetic methodology for alkyl substituted hydrazines, *Chem. Soc. Rev.*, 2001, 30, 205–213.
- 10 Hansen, T. K., Synthesis of azapeptides from hindered amines leading to novel growth hormone secretagogues. *Tetrahedron Lett.*, 1999, 40, 9119-9120.
- 11 Kost, A.N., Sagitullin, R. S., Синтез алкилгидразинов и пиразоловых эфиров диметилкарбаминовой кислоты., *J. Gen. Chem. (USSR)*, 1963, 33, 867-874.
- 12 Ou, J., Zhu, X., Wang, L., Xu, C., Liu, F., Ren, L., Xu, X., Wang, Y., Rui, C., Shangzhong Liu, S., Synthesis and Bioactivity Study of 2-Acylamino-Substituted N'-Benzylbenzohydrazide Derivatives., *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 10942–10951.

- 13 Spiegel, J., Mas-Moruno, C., Kessler, H., Lubell, W. D. Cyclic Aza-peptide Integrin Ligand Synthesis and Biological Activity. *J. Org. Chem.*, 2012, 77, 12, 5271–5278.
- 14 Lee, J., Bogoy, M. Development of Near-Infrared Fluorophore (NIRF)-Labeled Activity-Based Probes for in Vivo Imaging of Legumain. *Chem. Biol.* 2010, 5, 2, 233.
- 15 Busnel, O., Baudy-Floc'h, M. Preparation of new monomers aza- β -aminoacids for solid-phase syntheses of aza- β -peptides. *Tetrahedron Lett.*, 2007, 48, 5767.
- 16 Busnel, O., Bi, L., Dali, H., Cheguillaume, A., Chevance, S., Bondon, A., Muller, S., Baudy-Floc'h, M. Solid-Phase Synthesis of "Mixed" Peptidomimetics Using Fmoc-Protected Aza- β -amino Acids and α -Amino Acids. *J. Org. Chem.*, 2005, 70, 26, 10701.
- 17 Bernatowicz, M. S., Wu, Y., Matsueda, G. R. Urethane protected derivatives of 1-guanylpurazole for the mild and efficient preparation of guanidines. *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 3389-3392.
- 18 Freeman, N. S., Tal-Gan, Y., Klein, S., Levitzki, A., Gilon, C. Microwave-Assisted Solid-Phase Aza-peptide Synthesis: Aza Scan of a PKB/Akt Inhibitor Using Aza-arginine and Aza-proline Precursors. *J. Org. Chem.*, 2011, 76, 3078–3085
- 19 <http://www.sigmaaldrich.com/finland.html>
- 20 Carpino, L. A.; Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *J. Org. Chem.*, 1972, 37, 22, 3404 -3409.
- 21 Rabjohn, N., The Synthesis and Reactions of Disazodicarboxylates., *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, 70, 1181.
- 22 Calabretta, R., Gallina, C., Giordano, C., Sodium cyanoborohydride reduction of (benzyloxycarbonyl)- and (tert-butoxycarbonyl)hydrazones, *Synthesis*, 1991, 7, 536.
- 23 Kochi, J. K., Hammond, G. S., Benzyl Tosylates. I. Preparation and Properties, *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 3443-3444.
- 24 Ito, H., Ichimura, K., 4-(tert-Butoxycarbonyloxy)benzyl p-toluenesulfonates as acid amplifiers applicable to chemically amplified photoresists, *Macromol. Chem. Phys.*, 2000, 201, 132–138.
- 25 Brun, K., A., Linden, A., Heimgartner, H., New Optically Active 2H-Azirin-3-

- amines as Synthons for Enantiomerically Pure 2,2-Disubstituted Glycines :
 Synthesis of Synthons for Tyr(2Me) and Dopa(2Me), and Their Incorporation into
 Dipeptides, *Helv. Chim. Acta*, 2002, 85, 3422-3443.
- 26 Takeshi, K., Hidenor, W., Stereoisomers of monatin, their use as sweeteners, and
 preparation of them and their intermediates, Jpn. Kokai Tokkyo
 Koho (2002), JP 2002060382 A 20020226.
 - 27 Takeda, T., Mukayama, T., Asymmetric Total Synthesis of Indolmycin,
Chem. Lett., 1980, 163-166.
 - 28 Ruenitz, P C., Arrendale, R. F., Schmidt, W. F., Carolyn B. Thompson, C. B.,
 Nanavati, N. T., Phenolic Metabolites of Clomiphene:
 [(E,Z)-2-[4-(1,2-Diphenyl-2-chlorovinyl)phenoxy]ethyl]diethylamine.
 Preparation, Electrophilicity, and Effects in MCF 7 Breast Cancer Cells, *J. Med.*
Chem. 1989, 32, 192-197.
 - 29 James, P. N., Snyder, H.R., Organic Syntheses, Coll. Vol. 4, 1963, 539.
 - 30 Kornblum, N., Smiley, R. A., Blackwood, R.K., Iffland, D. C., The Mechanism of
 the Reaction of Silver Nitrite with Alkyl Halides. The Contrasting Reactions of
 Silver and Alkali Metal Salts with Alkyl Halides. The Alkylation of Ambident
 Anions, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 6269-6280.
 - 31 Dourlat, J., Liu, W.-Q., Nohad Gresh, N., Garbay, C., Novel 1,4-benzodiazepine
 derivatives with antiproliferative properties on tumor cell lines, *Bioorg. Med.*
Chem. Lett., 2007, 17, 2527–2530.
 - 32 Fässler, A., Bold, G., Capraro, H.-G., Cozens, R., Mestan, J., Poncioni, B.,
 Rösel, J., Tintelnot-Blomley, M., Lang, M., Aza-Peptide Analogs as Potent
 Human Immunodeficiency Virus Type-1 Protease Inhibitors with Oral
 Bioavailability, *J. Med. Chem.* 1996, 39, 3203-3216.
 - 33 Mäeorg, U., Pehk, T., Ragnarsson, U., Synthesis of substituted hydrazines from
 triprotected precursors, *Acta Chem. Scan.*, 1999, 53, 1127-1133.

Lisa:

TMR spektrid

Aine valem/nimetus:	Aine kood:
FmocNHNH ₂	ksen-389
Z-NHNH ₂	1/62
Fmoc-NHN=CH-CH ₂ -S-CH ₃	1/101
Boc-NHN=CH-CH ₂ -S-CH ₃	1/102(3)
Fmoc-NHNH-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃	1/103
Boc-NHNH-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃	1/104
4-metoksübensüülalkohol	1/87(2)
4-(<i>tert</i> -butüüloksükarbonüüloksü)bensüülalkohol	1/73(2)
((4-bensüüloksü)fenüül)metanool	1/136
<i>N</i> -bensüüloksükarbonüül-3-indolüülmetanool	1/111
4-(<i>tert</i> -butüüloksükarbonüüloksü)bensaldehüüd	1/38
<i>N</i> -bensüüloksükarbonüülindool-3-aldehüüd	1/108(2)
4-bensoksübensaldehüüd	1/135(2)
Indool-3-aldehüüd	1/28-3
4-metoksübensüülbromiid	1/88
(1- <i>tert</i> -butüüloksükarbonüüloksü)-4-bromometüülbenseen	1/79(7)
(1-bensoksü)-4-bromometüülbenseen	1/137(2)
1-bensüüloksükarbonüül-3-bromometüülindool	1/112
<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -bensüülhüdrasiin	1/58(2)
<i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -bensüülhüdrasiin	1/56
<i>N</i> -Z- <i>N'</i> -bensüülhüdrasiin	1/74(2)
<i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -4-metoksübensüülhüdrasiin	1/89
<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -4-metoksübensüülhüdrasiin	1/90
<i>N</i> -Z- <i>N'</i> -4-metoksübensüülhüdrasiin	1/92
<i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -((4- <i>tert</i> -butüüloksükarbonüüloksü)bensüül)hüdrasiin	1/95
<i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -(4-(bensüüloksü)bensüül)hüdrasiin	1/138
<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(4-(bensüüloksü)bensüül) hüdrasiin	1/139
<i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -((<i>N''</i> -bensüüloksükarbonüül-3-metüülindolüül)hüdrasiin	1/113
<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -((<i>N''</i> -bensüüloksükarbonüül-3-metüülindolüül)hüdrasiin	1/114